

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

SPIROCHÆTA HÆMOPHILUS

par JEAN TROISIER,
avec la collaboration de M^{lle} J. SIFFERLEN.

En nosologie humaine et animale, le domaine des spirochètoses aiguës s'accroît d'année en année. Le temps n'est plus où la seule spirochètose aiguë connue, la fièvre récurrente, avait acquis droit de cité après les recherches d'Obermaier. Les travaux mémorables d'Inada et Ido et de tous ceux qui les ont suivis ont montré en clinique humaine tout l'intérêt d'une autre spirochètose aiguë, dont le cadre, nous l'avons montré (1), dépasse singulièrement le domaine de l'ictère infectieux.

Aujourd'hui, nous apportons ici l'étude biologique d'un nouveau spirochète sanguicole, dont l'étude en clinique est poursuivie ailleurs avec les D^{rs} Lesné et H. Bénard. Il s'agit d'un germe trouvé par hémoculture sur un enfant, opéré pour une soi-disant appendicite qu'il n'avait pas, et considéré ensuite comme un soi-disant typhique qu'il n'était pas; une hémoculture pratiquée pendant les suites opératoires révéla que l'enfant était, en réalité, infecté par un spirochète autonome, dont nous donnons ici les caractères morphologiques, culturels et biologiques, et pour lequel nous proposons le terme de *Spirochaeta hæmophilus* (nv. sp.).

(1) J. TROISIER et Y. BOQUIEN. La Spirochètose méningée. Masson, édit., Paris, 1933.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Spirochaeta hæmophilus ne présente aucune difficulté d'examen avec les microscopes ordinaires, car il possède en général une longueur, une épaisseur et une colorabilité qui permettent de le reconnaître facilement dans les cultures.

Ce micro-organisme spiralé présente un corps protoplasmique



FIG. 1. — *Spirochaeta hæmophilus*. Culture de trois jours. Gross. : 1/1.450.
Photomicrographie Jeantet.

que sans membrane ondulante avec de larges spires. En général, sur une culture de trois jours on trouve un faible nombre de formes courtes et un plus grand nombre de formes longues. Ainsi sur 100 spirochètes fixés et colorés, on trouve :

Longueur minima	6 μ
Longueur maxima	16 μ
Longueur la plus fréquente.	9 μ

Sur les cultures très jeunes, au début de la prolifération (dix-huit à vingt-quatre heures), la formule ci-dessus serait inexacte : on peut ne trouver que des formes courtes et ultra-courtes n'atteignant pas 3 à 4 μ , si bien qu'un examen rapide ferait croire à un organisme coccobacillaire cilié. Dans les cultures vieilles, on note au contraire une prédominance des formes longues ; certains échantillons dépassent même 30 μ de longueur.

Le nombre des spires varie naturellement avec la longueur.

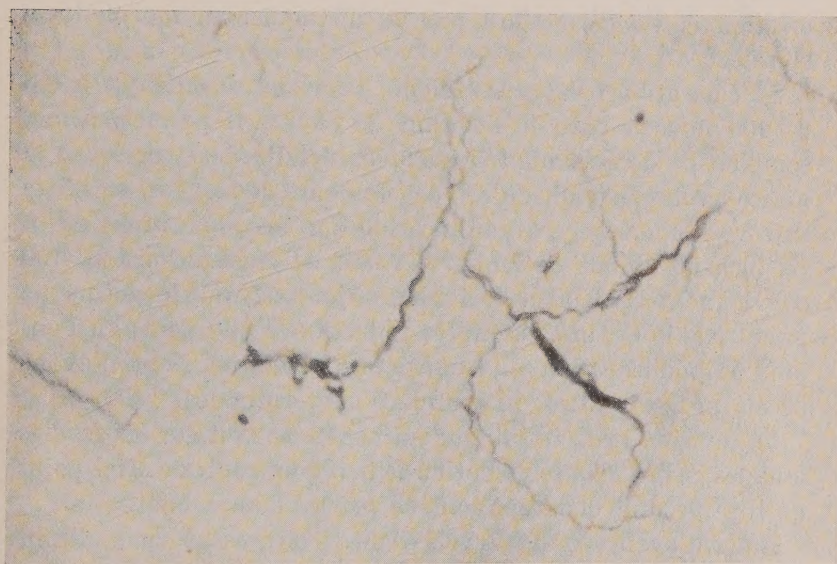


FIG. 2. — *Spirochæta hæmophilus*. Culture de huit jours. Gross. : 4/1.500.
Photomicrographie Jeantet.

Il y a 5 à 12 tours de spire pour les formes moyennes et longues, à peine 2 pour les formes courtes.

La hauteur des spires est très régulière, de 2 μ dans la partie centrale. Elle diminue légèrement aux deux bouts.

L'épaisseur du spirochète coloré est notable ; la plupart des individus ont la même épaisseur sur toute la région centrale, certains cependant s'épaississent nettement au centre. Tous ont les extrémités légèrement effilées. L'épaisseur

moyenne, difficile à préciser, oscille entre $0\ \mu\ 2\frac{1}{2}$ à $0\ \mu\ 4$. De ce fait, ce spirochète n'a rien à voir avec le groupe des leptospires, il s'apparente, au contraire, au groupe des spironèmes.

La mobilité du *Spirochaeta hæmophilus* est variable. Les formes moyennes et longues se déplacent dans le champ de l'ultra, à l'aide d'un mouvement de pas de vis, lent et régulier, permettant à l'observateur de l'étudier sans difficulté. Les formes ultra-courtes, au contraire, se déplacent avec une telle rapidité que l'œil les enregistre mal. On note des mouvements désordonnés en arc de cercle, en sinuosités défiant toute description et ne permettant pas de distinguer sa morphologie spiralée.

Sa coloration n'est pas difficile. Le violet de méthyle à 0,5 p. 100 nous a paru le colorant de choix. Il permet même, semble-t-il, de reconnaître quelques détails de structure : la masse protoplasmique n'est pas toujours homogène et laisse entrevoir une légère granulification sur les organismes âgés. La fuchsine diluée de Ziehl, le violet de gentiane à 1 p. 100 conviennent également fort bien. Ajoutons que le germe ne prend pas le Gram et qu'après réduction de l'argent, au Fontana Tribondeau, il prend une teinte brunâtre. Nous n'avons décelé ni axe central, ni granulations terminales.

La division transversale du spirochète se voit sur les formes longues : elles s'amincissent en leur région centrale à tel point qu'il se produit deux spirochètes accolés bout à bout.

Nous n'avons pas assisté à d'autres processus de multiplication ou de reproduction.

CARACTÈRES DE CULTURE.

Le caractère fondamental de ce micro-organisme en culture, c'est son impossibilité de proliférer si le milieu ne contient pas de sang frais. Ce caractère nous a paru suffisamment important pour justifier la dénomination de *Spirochaeta hæmophilus*.

Nous nous sommes arrêtés au milieu suivant :

Bouillon Martin	4 parties.
Sang frais total	1 partie.

Le sang frais et aseptique est prélevé à la veine (homme, chimpanzé, callitriche, lapin ou poule à volonté), dans une seringue et directement projeté dans des tubes à essai contenant le bouillon Martin préalablement stérilisé.

Après coagulation spontanée du sang dans les tubes, le milieu est prêt à servir. On peut également en contrôler l'asepsie par un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve.

L'addition au bouillon de sang défibriné ou citraté est moins favorable que le sang frais total.

Le pH le plus favorable est de 7,4. Après culture abondante, il ne se produit qu'une légère modification du pH, à 7,25.

La prolifération des spirochètes se reconnaît à peine à l'œil nu : tout au plus un léger trouble, sans aucun état moiré du bouillon.

Le germe pousse facilement à diverses températures : la température optima est de 37°, la température minima de 29°, la température maxima 40°.

A la température du laboratoire, les cultures sont repiquables, même après trois à quatre jours ; à 37°, elle résistent dix jours ; à la glacière (+ 4°) on peut les repiquer au bout de quinze jours. Les cultures ont pu être entretenues pendant neuf mois.

Les sels biliaires et la saponine (à 10 p. 100) ne produisent qu'un éclaircissement des cultures sans lyse complète.

Malgré l'épaisseur habituelle de son corps protoplasmique, nous pensons que ce spirochète peut passer à travers la bougie Chamberland L₁, car nous avons obtenu une nouvelle culture de spirochètes après filtration sur cette bougie. Le filtrat nous était apparu à l'examen direct, après centrifugation, dénué de tout organisme spiralé ; il contenait seulement des granules. En opposition avec ces résultats, obtenus avec la bougie L₁, dégrossisseur plutôt que filtre, signalons la négativité de nos filtrations avec la bougie L₂ qui s'est toujours montrée capable d'arrêter le passage des spirochètes.

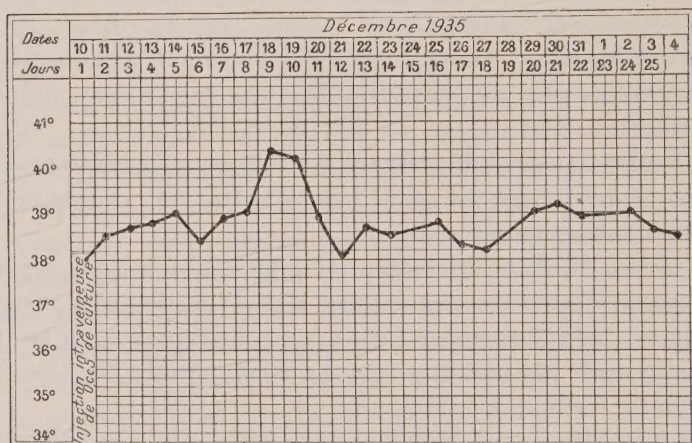
Non seulement le spirochète ne pousse pas dans les milieux liquides ordinaires, mais signalons expressément l'échec de nos cultures dans le milieu utilisé pour *Sp. ictero-hemorrhagiæ* (sérum de lapin au cinquième dilué dans l'eau physiologique),

dans le milieu N.N.N., dans le bouillon Martin additionné d'extrait globulaire, et dans le milieu de Wenyon.

POUVOIR PATHOGENE.

L'inoculation, même massive, de culture de *Sp. hæmophilus*, aux animaux courants de laboratoire, ne provoque chez eux aucun phénomène morbide apparent.

Chez le cobaye, on ne décèle aucune réaction thermique



TRACÉ 3. — Callitriche 147. Injection intraveineuse d'une culture de *Sp. hæmophilus*. Incubation de huit jours. Fièvre le neuvième et le dixième jour.

pendant les deux septénaires qui suivent l'injection. Des examens répétés à l'ultramicroscope ne permettent pas de trouver de spirochètes dans le sang. Mêmes recherches négatives pour le rat blanc, le lapin, la souris et la poule. Aucune action pathogène sur un lot de calcats, qui ne présentent pas de spirochétémie dans les douze jours qui suivent l'inoculation intra-musculaire.

Seuls les singes et l'homme ont montré, après l'inoculation, des troubles morbides incontestables.

Nous avons choisi, pour étudier l'action pathogène de ce spirochète sur les singes inférieurs, un lot de Callitriches neufs (*Cercopithecus callitrichus*), en parfaite santé et dont la doc-

lité était telle qu'elle permettait la prise régulière de la température.

Le premier d'entre eux (callitriche 147) reçoit dans la veine un 1/2 cent. cube d'une culture de trois jours, particulièrement vivace (10 décembre 1935). Les huit jours suivants, la température de l'animal ne dépasse pas la normale, oscillant entre 38°3 et 39°. Ce n'est que le neuvième jour de l'inoculation que la température saute brusquement à 40°4 pour se maintenir en plateau pendant deux jours (40°2 le dixième jour). A partir du onzième jour la courbe thermique se rapproche de la normale et l'animal guérit. Pendant la période fébrile, l'animal avait présenté seulement un peu d'anorexie. L'hémoculture trois fois pratiquée (cinquième jour, onzième et quatorzième jour) reste négative ainsi que la séro-agglutination (huitième et vingt-neuvième jour).

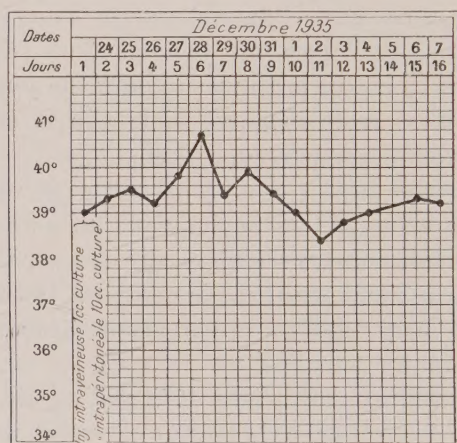
Néanmoins, sur un des nombreux frottis de sang de ce callitriche 147, nous avons vu, inclus dans un monocyte, un spirochète fort bien conservé malgré la phagocytose (sang du onzième jour, le lendemain de la réaction thermique). Trois mois après (3 mars 1936), l'animal meurt avec des lésions de broncho-pneumonie banale.

Un deuxième singe (callitriche 174) est inoculé le 23 décembre 1935 avec 1 cent. cube de culture de quarante-huit heures dans la veine et simultanément avec 10 cent. cubes de culture dans le péritoine. La température, d'abord normale, fait un crochet brusque à 40°7 le sixième jour pour retomber ensuite à la normale. L'hémoculture (huitième jour) ne décèle pas de spirochètes. La séro-agglutination (seizième jour) reste des plus douteuses : amas nets à l'ultra au dixième, aucune agglutination des spirochètes à 1 p. 50.

Deux autres singes devaient nous apporter ultérieurement des enseignements d'un autre ordre.

Le callitriche 674 reçoit, le 10 janvier 1936, 10 cent. cubes (2 cent. cubes dans la veine et 8 cent. cubes dans le péritoine) de culture. Il paraît n'en éprouver aucun mal; sa température reste aux alentours de 39°, sauf cependant le onzième et le quatorzième jour : 39°6 et 39°9. Pas de spirochètes dans le sang à l'ultra (huitième jour) ou à la culture (treizième jour).

L'animal paraît conserver une santé parfaite pendant deux mois. Il contracte une broncho-pneumonie dont il meurt le 19 mars 1936. A l'autopsie, on trouve plusieurs foyers de broncho-pneumonie banale. Les frottis de poumon, foie, reins ne présentent pas de spirochètes. La culture du sang du cœur devait nous révéler une surprise : à côté d'un pneumocoque typique du groupe I, avec phénomène de Neufeld, nous arrivons sans peine, sur milieu liquide au sang, à isoler un spirochète dont les caractères culturels se superposent presque



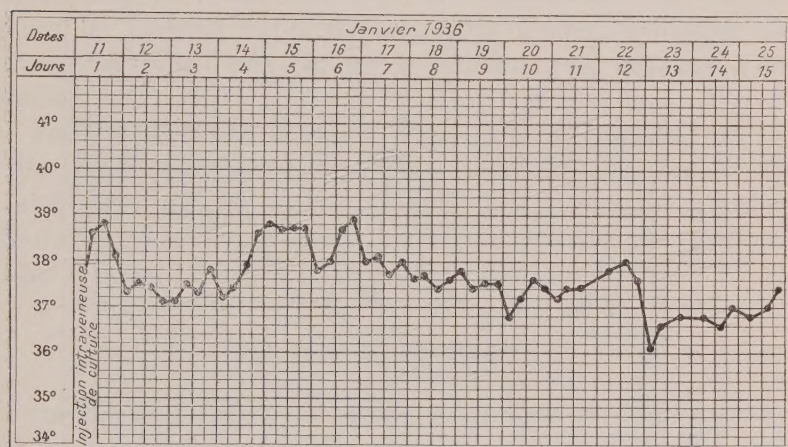
TRACÉ 4. — Callitriche 174. Inoculations intraveineuse et intrapéritonéale d'une culture de *Sp. hæmophilus*. Incubation de cinq jours. Fièvre le sixième jour.

entièrement au spirochète originel, retiré du sang de l'enfant et inoculé deux mois auparavant au singe.

Histoire analogue avec le callitriche 26. Inoculation intracérébrale, le 5 mars 1936, par voie rétro-oculaire, de 0 c. c. 2 de culture de quatre jours. Température suivie pendant vingt-huit jours sans modifications autour de 39°. Etat général parfait. Le sixième jour, examens négatifs à l'ultra du sang et de l'urine, uroculture et hémoculture également négatives. Un mois après (10 avril), alors qu'on avait cessé de prendre la température, le singe paraissant un peu souffreteux, on examine son sang à l'ultra : résultat négatif ; mais, par contre, l'hémoculture en milieu spécifique au sang révèle une spiro-

chétémie pure. Ce spirochète, par la suite, s'identifiait par ses caractères morphologiques et culturels au spirochète de l'enfant H...; il s'est cependant montré dénué de virulence pour un autre callitriche (n° 33).

Quatre jours plus tard (14 avril 1936), le callitriche mourait. Son autopsie ne décelait aucune broncho-pneumonie ni aucune lésion viscérale importante; les reins s'avéraient seulement un peu pâles et les ganglions inguinaux légèrement hypertrophiés, comme le fait est fréquent chez les singes. Le



TRACÉ 5. — Homme (Ar. M.). Injection intraveineuse de culture de *Sp. hæmophilus*. Incubation de quatre jours. Fièvre les cinquième et sixième jours.

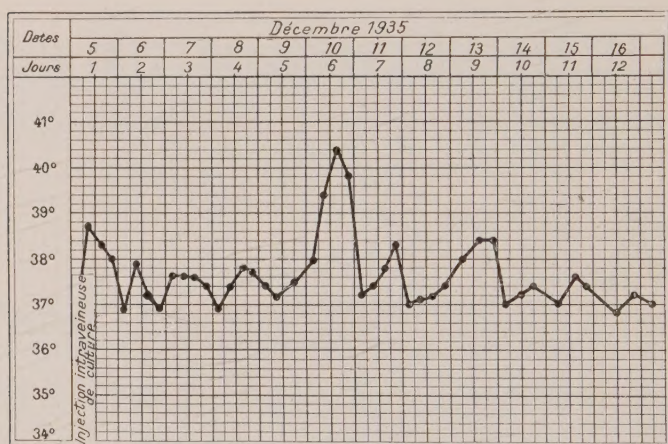
foie et la rate étaient rigoureusement normaux. Par inadvertance, il n'est fait aucun frottis ni examen histologique.

Voilà donc, sur le cercopithèque callitriche, deux types de maladies expérimentales assez différentes. Dans l'une, le tracé thermique, après une incubation de cinq à huit jours, donne une réaction fébrile précise ($40^{\circ}4$, $40^{\circ}7$) dépassant d'un degré et demi la température normale du singe. Cette réaction thermique est purement temporaire et dure au plus deux jours. Il n'y a pas de récurrence franche secondaire et la température revient à la normale. L'animal guérit.

Dans l'autre type, la réaction fébrile de la fin du premier septénaire fait défaut. On se trouve en présence d'une maladie

lente avec légère hyperthermie, peu caractéristique. La maladie est presque inapparente! Elle se caractérise seulement au point de vue biologique par l'isolement tardif (un à deux mois après l'inoculation) du spirochète pathogène dans le sang. Dans un cas typique, la spirochétémie est pure et l'animal meurt quatre jours après sans lésions macroscopiques ; dans l'autre, la spirochétémie est associée à une septicémie à pneumocoque I et à des lésions de broncho-pneumonie.

Chez l'homme, la maladie expérimentale se rapproche sin-



TRACÉ 6. — Homme (L. Lep.). Injection intraveineuse de culture de *Sp. hæmophilus*. Incubation de cinq jours. Fièvre le sixième jour.

gulièrement du premier type de la maladie simiesque. Deux sujets, paralytiques généraux, chez qui la pyrétothérapie était formellement indiquée, reçurent par voie veineuse la culture du spirochète de l'enfant à la dose de 3 et 10 cent. cubes. Tous deux, après avoir fait immédiatement (de la troisième à la neuvième heure) une réaction thermique sans valeur, liée sans doute aux protéines du bouillon inoculé, restèrent pendant trois et quatre jours sans fièvre. Le cinquième jour pour l'un, le sixième jour pour l'autre, la température monta brusquement à 40,4 pour l'un, à 38,8 pour l'autre. Pour le premier, la poussée thermique ne dure qu'un jour, comme chez le callitriche 174; pour le second, elle dure deux jours, comme

chez le callitriche 147. Le tracé thermique reste légèrement troublé pendant le septénaire suivant, sans qu'on puisse parler de récurrence vraie, puis il devient rigoureusement normal. Les deux sujets, suivis trois mois, ne font, par la suite, aucun phénomène morbide nouveau (1).

Ajoutons que nous n'avons pu, par l'hémoculture ni par l'uroculture, mettre en évidence le spirochète dans les humeurs. Mêmes résultats négatifs à l'ultramicroscope. Le passage à un callitriche (n° 169) du sang d'un des deux sujets, au moment de l'acmé thermique n'a malheureusement pas été suivi de maladie expérimentale. (Pas d'altération nette du tracé thermique, hémoculture au huitième jour négative, guérison.)

En résumé, chez l'homme, *Spirochæta hæmophilus* provoque, après injection intraveineuse, une maladie caractérisée essentiellement par une *incubation brève, de quatre à cinq jours*, et par une *réaction thermique violente, éphémère et sans récurrence*.

RÉACTIONS D'AGGLUTINATION.

Sp. hæmophilus ne nous a pas paru provoquer d'une manière constante, dans les diverses espèces animales, des réactions spécifiques d'agglutination.

Au point de vue technique, nous avons employé une méthode identique à celle préconisée par Martin et Pettit pour *Sp. ictero-hemorragiæ*. Dilution du sérum à éprouver avec de l'eau salée à 9 p. 1.000 ; cultures vivaces, de trois jours ; contact d'une heure en tubes à hémolyse à l'étuve, examen immédiat à l'ultramicroscope entre lame et lamelle. L'examen, après séjour plus prolongé des tubes à la température du laboratoire (deuxième à sixième heure), ne donne pas de résultats plus précis.

Avec les sérums humains, nous n'avons rien obtenu de net.

(1) Deux autres sujets inoculés ultérieurement avec la culture n'ont présenté aucun phénomène morbide. Il est vraisemblable que les passages successifs en milieux artificiels, ont atténué la virulence du germe, malgré sa parfaite végétabilité.

Le sérum de l'enfant H..., pendant et après la maladie, n'agglutinait qu'à 1 p. 10 le germe retiré par hémoculture. Les sérums des sujets inoculés (L. et A.) n'agglutinaient même pas au dixième, à plusieurs examens successifs.

Mêmes résultats négatifs avec les singes, qu'ils aient fait ou non des poussées thermiques.

Par contre, les sérums de deux poules, inoculées dans la veine avec la culture du *Sp. hæmophilus*, montrèrent au bout d'un mois un pouvoir agglutinatif élevé (1 p. 800 et 1 p. 1.000); après trois mois, le taux baissait à 1 p. 200 et à 1 p. 300. Au contraire, le sérum des poules neuves, et en particulier celui des deux animaux précités avant l'injection, est négatif à 1 p. 25.

Nous ne proposons pas d'interprétation pour ces constatations contradictoires, en opposition chez la poule et chez l'homme.

Pour compléter ces données sérologiques, signalons que les sérums d'homme (l'enfant H...) ou de poules inoculées n'agglutinent pas (à 1 p. 25) une culture de *Sp. marchouxi*.

De même, le sérum de l'enfant H... (dix-huitième jour) et celui d'un homme inoculé avec succès (L., au dix-septième jour), ne provoque aucune agglutination sur une souche de *Sp. ictero-hemorragiae* (M^{le} Erber).

L'épreuve de Pfeiffer sur le péritoine des souris ne nous a pas donné de résultats utiles pour l'identification bactériologique.

*
* *

Tels sont les caractères de *Spirochæta hæmophilus*. Ce germe présente, à notre avis, une autonomie suffisante pour justifier son isolement parmi les spirochétidés pathogènes pour l'homme.

Ses caractères morphologiques l'écartent complètement des Tréponèmes et des Leptospires. Il fait partie du groupe des spirochètes épais, des *Spironema* de Noguchi (*Sp. vincenti*, *Sp. bronchialis*...).

Ses caractères de culture le distinguent parmi tous les spi-

rochètes, et en particulier parmi les spironèmes ; son affinité pour l'hémoglobine justifie la terminologie d' « *hæmophilus* » que nous proposons.

Ses caractères de virulence sur l'homme et sur le singe montrent nettement qu'il ne s'agit pas d'un spirochète saprophyte sans valeur pathogène. La virulence expérimentale vient donner une haute valeur à la constatation de ce germe dans la circulation sanguine de l'homme et permet de croire que cette spirochètémie n'est pas le fait d'un microbe saprophyte.

Dans une certaine mesure, ce germe ressemble à *Spirochaeta sinensis* décrit par Pons en 1923 (2) : même aspect morphologique, symptomatologie clinique un peu analogue, même culture en bouillon sang au cinquième. Mais *Sp. sinensis* se cultive également en sérum de lapin-eau physiologique et en milieu Novy-Nicolle ; il est franchement virulent pour le cobaye chez qui il provoque de la fièvre et des lésions locales violentes au point d'inoculation.

Parmi les autres spirochètes sanguicoles décrits dans la littérature (3), aucun ne peut prétendre à être identique à *Sp. hæmophilus*.

A l'opposé des leptospires, ce spirochète ne possède qu'une valeur antigénique médiocre et inconstante. Ceci le rapproche des *Sp. récurrents*, dont les nombreuses variétés ne peuvent être caractérisées sérologiquement (Nicolle). Néanmoins, *Sp. hæmophilus* n'est pas *Sp. recurrentis* : jamais, ni sur le singe ni sur l'homme, nous n'avons observé de récurrence vraie. Rappelons aussi que les différents spirochètes récurrents n'ont jamais pu être réellement cultivés.

Un dernier problème, difficile à résoudre, est celui de la porte d'entrée de ce germe dans l'organisme humain. L'importance des phénomènes intestinaux dans l'observation clinique originelle soulève l'hypothèse de l'origine intestinale de ce spirochète.

(2) R. PONS. Organisme spiralé mobile isolé en hémoculture au cours d'une fièvre à caractère récurrent, *S. R.*, **89**, 1923, p. 1028. — R. PONS. Sur la nature d'un germe spiralé isolé en hémoculture au cours d'une maladie fébrile à caractère récurrent, *S. B.*, **90**, 1924, p. 396.

(3) Aug. PERRIN. Contribution à l'étude des Spirochétidés, Vanves, 1928, chez l'auteur.

CONCLUSIONS.

1° *Spirochaeta haemophilus*, retiré par hémoculture chez un enfant atteint de troubles intestinaux avec fièvre continue, se caractérise surtout par ses cultures et sa virulence ;

2° Ses caractères morphologiques l'écartent du groupe des leptospires et de celui des tréponèmes. On peut le ranger parmi les spironèmes de Noguchi ;

3° Ses caractères de culture en font un organisme hémoglo-binophile ;

4° Son pouvoir pathogène, jusqu'à plus ample informé, se limite à deux espèces : l'homme et le singe (*Cercopithecus callitrichus*) ;

5° La maladie expérimentale, après injection intraveineuse, peut revêtir deux modalités : l'une typique, l'autre quasi inapparente.

La maladie nettement constituée est caractérisée, chez le singe comme chez l'homme, par une poussée fébrile éphémère, précédée d'une période d'incubation de quatre à huit jours et non suivie de récurrence.

La maladie lente et inapparente se révèle tardivement sur le singe par une spirochétémie que l'hémoculture seule met en évidence.

ACTION DU VENIN DE COBRA *IN VITRO* ET *IN VIVO* SUR UN SARCOME EHRLICH DE LA SOURIS

par A. BESSEMANS et L. ASAERT.

(*Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de l'Etat,
à Gand. Directeur : Prof. Dr A. BESSEMANS.*)

(QUATRIÈME NOTE)

A. — HISTORIQUE.

D'après Lavedan [40], quoique Laignel-Lavastine et Koressios aient signalé d'abord des succès obtenus en traitant 5 cas d'algies cancéreuses par le venin de Cobra [8], la priorité de l'observation de l'effet de ce poison sur le cancer chez l'Homme revient, en raison du grand nombre d'essais institués, à Monaelesser et Taguet [41]. Les espoirs thérapeutiques que firent naître les conclusions de ces derniers, selon qui « le traitement par le venin de Cobra doit rendre des services dans toutes les algies et particulièrement dans celles des tumeurs bénignes et malignes » dont les dernières « en bénéficient dans leur évolution », se trouvèrent, dit Lavedan, « sérieusement étayés par la parution, presque contemporaine, des résultats de recherches expérimentales, entreprises par Calmette, Saenz et Costil » [3]. Ceux-ci, en effet, après avoir appliqué à l'étude de greffes cancéreuses et d'un adéno-carcinome spontané de la Souris une solution de venin de Cobra identique à celle utilisée par Taguet et Monaelesser, admirent que le venin ne possède aucun pouvoir vaccinant, mais qu'il se fixe sur le greffon et « exerce un effet curatif indubitable » consistant, soit dans la fonte du tissu adéno-carcinomateux, soit dans son élimination à l'extérieur ou sa résorption totale en quinze à vingt jours.

Depuis lors, Taguet [44], Gueytat [6], L. et R. Dieulafoy [4], Ravina [43], Peck et Goldberger [42], Laignel-Lavastine et Koressios [9] et d'autres (Cf. Lavedan) instituèrent des essais

analogues chez l'homme, d'ailleurs avec des résultats variables (1).

Mais les nouvelles recherches sur l'animal demeurèrent relativement peu nombreuses et se limitent, pour autant que nous sachions, à celles de Grasset et des Ligneris [5], ainsi que de Julius [7].

Grasset et des Ligneris [5] étudièrent, soit par contact direct *in vitro*, soit par injections locales *in vivo*, l'action des venins et anavenins de Cobra et de Vipères sur le sarcome de Rous des Poules, et sur les mélanomes spontanés de la Chèvre angora et du Cheval. Les néoplasmes de ces Mammifères présentèrent des régressions très prononcées mais passagères (2). Chez un certain nombre de poules sarcomateuses survint un retard dans l'apparition ou le développement des tumeurs ; mais comme il ne fut pas possible de reproduire ces résultats en série, les auteurs estimèrent qu'il s'agissait plutôt d'une action non spécifique, similaire à celle qu'eux-mêmes et d'autres ont observée à la suite d'injections de toxines, ainsi que d'infections microbiennes provoquées ou spontanées.

Julius [7] rapporte qu'en injectant du sérum de Cobra

(1) De l'ensemble de ces travaux, écrit Lavedan, il est permis de conclure que le venin de Cobra, même lorsqu'il est injecté dans les tumeurs, est sans action sur les cancers humains. Quelques cas d'amélioration ou exceptionnellement de guérison ont été signalés. Ils sont trop peu nombreux pour qu'on puisse fonder un espoir sur cette méthode, surtout si on veut bien se souvenir qu'en cancérologie il n'est pas absolument exceptionnel de voir des tumeurs abandonnées à elles-mêmes se stabiliser spontanément et même régresser de façon plus ou moins marquée.

L'action sur les algies cancéreuses n'est, par contre, pas niable ; mais elle est inconstante, irrégulière, souvent très lente à se produire, et le nombre des malades qui n'éprouvent aucune amélioration de leurs douleurs, même à la suite d'un traitement prolongé, est incontestablement très grand.

Dans ces conditions et quand il s'agit de cancéreux incurables, il paraît logique de réserver le venin pour les cas rares où la morphine se révèle inopérante. Pour les autres, cette dernière garde toutes ses indications, d'autant plus que si on s'en tient aux essais thérapeutiques réalisés par H.-R. Calderon [2], avec le venin de *Lachesis alternatus*, il est vraisemblable qu'il y a avec les venins de Serpent une accoutumance aussi nette qu'avec la morphine.

(2) Cette régression ne s'est pas maintenue, disent les auteurs, ce qui peut être la conséquence de la production d'anticorps antivenimeux, qui neutraliseraient l'effet des antigènes injectés.

autour et dans des cancers de goudron chez la Souris, il n'a jamais constaté le moindre effet thérapeutique ni sur la croissance du néoplasme ni sur la quantité des métastases trouvées à l'autopsie. Cet auteur a pourtant utilisé des doses hebdomadaires allant jusqu'à la moitié d'une U. S. ; dès ce moment, certains animaux en souffrirent et quelques-uns succombèrent avec des signes d'intoxication aiguë.

B. — RECHERCHES PERSONNELLES.

Disposant d'une tumeur sarcomateuse (souche Ehrlich), dont l'inoculation sous-cutanée en quantité donnée fournit, chez la Souris blanche, 100 p. 100 de résultats positifs (1), nous avons étudié l'action du venin de Cobra sur ce néoplasme, en nous servant du « cobranyl » préparé par la « Division Meurice » de l'Union chimique belge. On sait que ce produit se délivre sous la forme de solutions à 4 concentrations : 1/100, 1/50, 1/25 et 1/10 de milligramme. Nous avons institué des essais *in vitro* et *in vivo*.

a) EXPÉRIENCES *in vitro*. — Des fragments de la grandeur d'une fève furent découpés de la coque charnue de tumeurs âgées d'une vingtaine de jours et plongés durant vingt-quatre heures, les uns à 6° et les autres à 17°, chacun dans 1 cent. cube de solution de « cobranyl » au 1/25, au 1/50 ou au 1/100 de milligramme ; en même temps des fragments semblables, servant de contrôles, furent traités de la même façon dans l'eau physiologique. Les différents fragments furent ensuite retirés de leur liquide, réduits en bouillie et injectés sous la peau dorsale de la Souris à raison de 0 c.c. 1 de bouillie par animal.

Les fragments-contrôles, administrés à 10 souris, développèrent chez toutes, après sept à huit jours, un sarcome qui grandit et évolua au bout d'un mois environ vers la mort de l'animal.

40 autres souris, inoculées par moitié au moyen de fragments imbibés depuis un jour de « cobranyl » au 1/25 ou au 1/50, ne présentèrent aucune lésion clinique et survécurent ; leur inoculat fut résorbé du sixième au septième jour.

Enfin, sur 20 souris injectées au moyen de produit sarcomateux imbibé depuis vingt-quatre heures de « cobranyl » au 1/100, 13 demeurèrent indemnes, tandis que 7 développèrent, après une quinzaine de jours, une tumeur molle de la grandeur d'une fève, qui évolua comme chez les témoins.

b) EXPÉRIENCES *in vivo*. — Celles-ci furent pratiquées dans un but préventif et curatif avec les 3 concentrations de « cobranyl ».

1° *Action préventive*. — Chaque souris d'un premier lot de 20 animaux reçut au même endroit, sous la peau de la région dorsale, 0 c. c. 5 de la solution au 1/100 de milligramme et, immédiatement après, 0 c. c. 1 de bouillie de coque charnue virulente. Chez toutes, le sarcome apparut et grandit comme d'habitude, mais présenta dès le début un ramollissement net. Celui-ci conduisit à la nécrose et à l'infection secondaire. Tous les animaux succombèrent dans les cinq semaines, les uns à leur tumeur, les autres à l'infection.

Un deuxième lot de 20 souris fut traité de la même façon, mais avec du « cobranyl » au 1/50 de milligramme. La moitié mourut sept à huit jours plus tard, sans avoir présenté un développement tumoral. Chez 5 autres, l'apparition et l'évolution du néoplasme ne parurent aucunement influencées et la mort survint dans le délai habituel. *Chez les 5 souris restantes, le sarcome apparut mais se nécrosa d'emblée et progressivement, si bien que sa fonte fut complète le quinzième jour après l'inoculation et que la survie fut définitive sans autres séquelles qu'une cicatrice locale.*

10 souris d'un troisième lot reçurent chacune, comme les précédentes, 0 c. c. 1 de bouillie de coque charnue, mais, en plus, au même endroit, immédiatement avant, 0 c. c. 5 de « cobranyl » au 1/25 de milligramme. Aucune d'entre elles ne survécut plus de vingt-quatre heures.

2° *Action curative*. — 15 souris, porteuses d'une tumeur sarcomateuse de la grandeur d'une fève (dix jours d'âge), reçurent à trois reprises, avec deux jours d'intervalle, une injection intra- et péritumorale de 1 cent. cube de « cobranyl » au 1/100 de milligramme. Pour aucun de ces animaux l'évo-

lution ultérieure du néoplasme ne fut modifiée en quoi que ce soit.

7 souris, porteuses de tumeurs volumineuses (trois semaines d'âge), furent traitées journellement, à partir de la troisième semaine d'inoculation, au moyen de ces mêmes injections : elles en reçurent en tout chacune de 6 à 8. Les tumeurs ne furent pas influencées et le décès survint dans le délai habituel.

Chez 15 souris, atteintes de tumeurs moyennes (quinze jours d'âge), une injection intratumorale de 1 cent. cube de « cobranyl » au 1/50 de milligramme, répétée après deux jours, provoqua la mort, par intoxication, le lendemain de la seconde injection.

Toutes les souris d'un dernier lot de 10, porteuses d'un sarcome (de quinze jours d'âge), succombèrent de même à la suite d'une seule injection intratumorale de 1 cent. cube de « cobranyl » au 1/25 de milligramme.

CONCLUSIONS.

1° Il est possible d'empêcher, chez la Souris blanche, l'apparition d'un sarcome Ehrlich qui éclot et se développe mortellement sans exception chez elle, à la suite d'une inoculation hypodermique de 0 c. c. 1 de bouillie tissulaire virulente, en immergeant au préalable, durant vingt-quatre heures aux températures de 6° ou de 17°, un fragment de la tumeur devant servir aux inoculations, dans une solution de « cobranyl » au 1/25 de milligramme (20 succès sur 20), au 1/50 de milligramme (20 succès sur 20) ou même au 1/100 de milligramme (13 succès sur 20).

2° Nous avons pu obtenir, chez 5 souris sur 20, la nécrose aussitôt progressive et la disparition totale et définitive du sarcome apparu à la suite de l'inoculation sous-cutanée de la dose néoplasique mortelle, en leur injectant au même endroit, immédiatement avant, 0 c. c. 5 d'une solution de « cobranyl » au 1/50 de milligramme.

3° Par contre, aucune souris n'a pu être débarrassée de son néoplasme au moyen d'une ou de plusieurs injections intra- et péritumorales de « cobranyl » au 1/100, au 1/50 ou

au 1/25 : ou bien les animaux succombèrent à l'intoxication par le venin, ou bien le développement et l'évolution fatale se produisirent comme chez les animaux témoins.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BESSEMANS (A.) et ASAERT (L.). *Ces Annales*, **57**, n° 5, novembre 1936, p. 516.
- [2] CALDERON (H. R.). *Bol. Inst. Med. Esp.*, Buenos-Ayres, **11**, 1934, p. 82 selon Lavedan [10].
- [3] CALMETTE (A.), SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. Acad. Sc.*, **197**, n° 3, 17 juillet 1933, p. 205 ; *Echo médical du Nord*, **36**, n° 37, 18 septembre 1933.
- [4] DIEULAFÉ (L. et R.). *Bull. Soc. Chirurgie de Toulouse*, 30 nov. 1933, selon Lavedan [10].
- [5] GRASSET (E.) et DES LIGNERIS (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 2 juin 1934, p. 386.
- [6] GUEYTAT. *Bull. Soc. nation. Médecine et Sciences médicales de Lyon*, 22 nov. 1933, selon Lavedan [10].
- [7] JULIUS (H. W.). *Acta brevia neerl.*, vol. V, n° 3-4, 25 mai 1935, p. 49.
- [8] LAIGNEL-LAVASTINE et KORESSIOS (N. T.). *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, n° 7, 49^e année, 6 mars 1933, p. 274.
- [9] LAIGNEL-LAVASTINE et KORESSIOS (N. T.). *Journées médéc. Paris*, **103**, n° 30, 27 juillet 1933, selon Lavedan [10].
- [10] LAVEDAN (J.). *Paris Médical*, n° 11, 25^e année, 16 mars 1935, p. 221.
- [11] MONAELESSER et TAGUET (Ch.). *Bull. Acad. Méd. Paris*, **109**, n° 11, 14 mars 1933, p. 371.
- [12] PECK (S. M.) et GOLDBERGER (M. A.). *Amer. Jour. of Obst. a. Gynecology*, **25**, n° 6, 6 juin 1933.
- [13] RAVINA (A.). *La Presse Médicale*, n° 1, 3 janvier 1934, p. 4.
- [14] TAGUET (Ch.). *Bull. et Mém. Soc. médecine Paris*, 8 décembre 1933 ; *ibidem*, 23 juin 1934, selon Lavedan [10].

BACTÉRIOLOGIE DES PNEUMONIES DE L'ENFANCE

[DEUXIÈME MÉMOIRE (1)]

ROLE ÉTIOLOGIQUE DES PNEUMOCOQUES DU GROUPE X DANS LES PNEUMONIES DE L'ENFANCE ET DÉTERMINATION DU TYPE DE CES GERMES

par L. K. VIKTOROFF, D. I. OSTROVSKAIA, E. A. LEWTCHENKO,
J. F. DOMBROVSKAIA, E. A. REICHERT et S. A. MAGARIK.

Laboratoire de microbiologie (Chef : D^r L. K. VIKTOROFF) de l'Institut Tarassévitch de Contrôle des Sérums et Vaccins (Directeur : D^r G. L. KOUTCHAIDZÉ). Clinique des maladies des enfants (I^{er} Institut de Médecine, Professeur : W. S. MOLTCHANOFF). Clinique des maladies du premier âge (II^e Institut de Médecine, Professeur : S. O. DOULITZKI). Clinique des maladies des enfants (II^e Institut de Médecine, Professeur : P. O. LOUNTZ).

Le rôle des pneumocoques du groupe X dans l'étiologie des infections pneumococciques est considérable. 40 p. 100 des pneumonies aiguës de l'adulte (Viktoroff, Zemtowa, Ettinger) et 50 p. 100 des pneumonies franches de l'enfance (Viktoroff, Dombrovskaia et Jerofeff) sont occasionnées par des pneumocoques sérologiquement non différenciés. Mais c'est dans l'étiologie des broncho-pneumonies que les pneumocoques du groupe X jouent un rôle prépondérant ; 90 p. 100 des souches isolées dans les broncho-pneumonies de l'enfance appartiennent au groupe X (Viktoroff, Dombrovskaia, Jerofeff). D'après Gundel, Sutliff et Finland, les pneumocoques du groupe X prédominent également dans les broncho-pneumonies de l'adulte. On comprend donc l'importance que présente le problème de la différenciation sérologique des souches constituant actuellement le groupe X, différenciation dont dépendent la thérapie spécifique, la prophylaxie et l'épidémiologie des broncho-pneu-

(1) V. Ztbl. f. Bakt. Orig. I. Bd., 132, 1934, 413.

monies. Les tentatives ayant pour but de déterminer par des procédés sérologiques les différentes races englobées dans le groupe X, datent de longtemps. C'est ainsi que Avery, en 1915, en s'aidant de la réaction d'agglutination avec un sérum du type II, a réussi à différencier le sous-groupe II. Ce dernier a été subdivisé à son tour en deux autres groupes : A et B, soigneusement étudiés par Stillman en 1919. Les recherches de Lister dans l'Afrique du Sud, en 1916, ont montré qu'un tiers des souches isolées dans les pneumonies franches aiguës appartiennent à un même type sérologique relevant du groupe X. Olmstead, en 1916, et Clough, en 1917, en étudiant, l'un 243 souches, et l'autre 94 souches du groupe X, sont arrivés à différencier 12 types-sérologiques. Griffith a isolé dans les infections des voies respiratoires, 49 souches qui appartenaient également à 12 types sérologiques, parmi lesquels les races correspondant aux sous-groupes A et B de Avery prédominaient. Robinson, en 1927, a subdivisé les 65 souches isolées en 8 types ; il a aussi démontré le rôle étiologique de l'un d'eux dans une épidémie de pneumonie. Sugg, Gaspari, Fleming et Neill, ensuite Harris, Sugg et Neill ont décrit des souches qui, par leurs réactions sérologiques, approchaient du type III.

Enfin, les recherches approfondies de Cooper et de ses collaborateurs ont résolu le problème important de la différenciation sérologique des pneumocoques. En 1929, Cooper a différencié dans le groupe X, 10 types, et, en 1932, 28 types nouveaux. En se servant de ces 28 antigènes, cet auteur a préparé 28 sérums spécifiques agglutinants et thérapeutiques.

Les 28 types de Cooper englobaient la majorité des souches des pneumocoques, jusqu'ici non différenciées, aussi bien que les types décrits par d'autres auteurs.

Les travaux concernant la différenciation sérologique des pneumocoques du groupe X, isolés dans différentes affections, dans les pneumonies des enfants en particulier, sont peu nombreux et sont surtout dus aux auteurs américains.

Cooper et ses collaborateurs ont différencié, de 1928 à 1930, 278 souches isolées dans les pneumonies aiguës de l'adulte, et 136 souches dans les pneumonies franches de l'enfance. 28 sérums (I-XXVIII) spécifiques ont servi à faire cette étude. La quantité des pneumocoques restés non différenciés est tombée

à 10 p. 100. Plummer, Raia et Schultz, en 1928, en se servant de 13 sérums (I-XIII) n'ont pas pu différencier 49 p. 100 de 140 souches isolées dans les pneumonies de l'enfance. Dans leur travail ultérieur, de 1928 à 1930, les mêmes auteurs se sont servis de 24 sérums ; dans ces conditions, le pourcentage des pneumocoques non différenciés est tombé de 75 à 13. Suttliiff et Finland, en 1933, ont réussi à différencier, à l'aide de 20 sérums, 85 p. 100 des 1.264 souches isolées dans les pneumonies lobaires et les broncho-pneumonies de l'adulte. En Allemagne, Gundel et ses collaborateurs se sont occupés de la même question.

Schröder et Cooper ont démontré l'importance de la détermination des types de pneumocoques en épidémiologie ; ces auteurs, en étudiant une épidémie dans un asile d'enfants, ont constaté la contagiosité toute particulière des pneumocoques du type V.

Enfin, Webster et Hughes, dans leurs études épidémiologiques, se sont également servis de la méthode sérologique en s'aidant de 24 sérums.

Pendant ces dernières années, nous nous sommes consacrés à l'étude de la bactériologie, de la thérapie spécifique et de la prophylaxie des affections occasionnées par les pneumocoques du groupe X. L'étude bactériologique des affections pneumococciques de l'enfance a été effectuée dans trois services de clinique infantile, du 1^{er} et du 2^e Institut de Médecine de Moscou.

Notre étude a porté sur 350 cas de pneumonie dont 100 pneumonies franches aiguës (lobaires) et 250 bronchopneumonies (lobulaires). L'âge des enfants malades était compris entre quinze à vingt jours et douze ans. L'examen bactériologique des crachats et du pus des complications était de règle ; dans certains cas, desensemencements du sang ont été pratiqués ; nous y avons souvent ajouté l'examen bactériologique des pièces d'autopsie. Toutes les souches ont été différenciées par la méthode sérologique. De plus, des recherches complémentaires ont été effectuées concernant la bactériologie et l'immunité dans les pneumonies de l'enfance.

L'étude expérimentale comprenait :

a) ISOLEMENT DES PNEUMOCOQUES.

L'examen des crachats, du sang, du pus et des pièces d'autopsie a été pratiqué selon les procédés décrits dans notre travail précédent (Viktoroff, Dombrowskaia et Jerofeeff). L'expectoration des enfants en bas âge était recueillie sur un tampon, celle des enfants plus âgés dans un crachoir. Pour simplifier le travail, nous avons inoculé directement des souris blanches avec des crachats, du pus ou des pièces d'autopsie, sans ensemencement préalable sur la gélose au sang. Les souris infectées restaient en observation pendant six jours ; en cas de survie, l'inoculation était répétée. L'identification des souches se faisait en général par ensemencement dans la bile (dissolution).

Toutes les souches du groupe X isolées ont été conservées soit à la glacière, soit dans du sérum semi-liquide, soit sous cloche à vide dans des organes desséchés de souris, ayant succombé à la septicémie pneumococcique.

b) TECHNIQUE SÉROLOGIQUE.

La détermination des types de pneumocoques a été effectuée par l'épreuve de la micro-agglutination avec les 31 sérums spécifiques (I-XXXI) que nous devons à l'amabilité du docteur Cooper (du laboratoire de Park, à New-York).

La différenciation de chaque souche par l'épreuve de la macro-agglutination, d'une part, et de l'autre les quantités insignifiantes de sérum que nous avons eues à notre disposition, nous ont contraints à chercher une méthode simplifiée pour faire ces déterminations. Celle de Sabin nous a semblé la plus appropriée ; elle est simple, économique et suffisamment précise.

On dépose sur un porte-objet, avec une grande anse de platine (2 millimètres de diamètre), plusieurs gouttes d'une culture de dix-huit heures en sérum-bouillon additionné d'une goutte de chaque sérum spécifique (I-XXXII) convenablement dilué (les dilutions habituelles sont de 1/5-1/20) ; une goutte de culture émulsionnée en solution physiologique sert de contrôle ; les préparations séchées et colorées à la fuchsine diluée sont très démonstratives : des amas plus ou moins grands de pneumocoques, en cas de résultat positif, se distinguent visiblement des germes disséminés dans tout le champ microscopique (fig. 1). Cas négatifs (fig. 2).

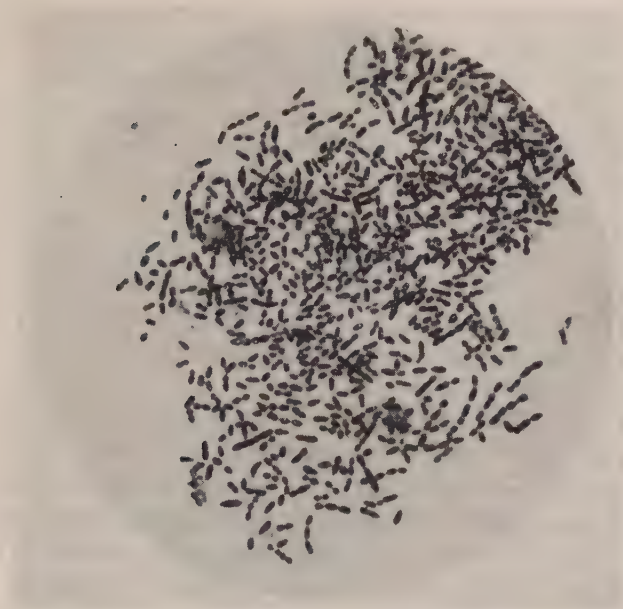


FIG. 1.



FIG. 2.

La détermination sérologique du germe isolé par inoculation à la souris a toujours été vérifiée par la différenciation de la culture, obtenue en partant d'une colonie isolée.

En cas d'agglutination dite de groupe, nous avons toujours réussi à déterminer le vrai type en augmentant les dilutions des sérums. Il nous est aussi arrivé d'avoir affaire à des cultures mixtes ; nous avons, dans ces conditions, multiplié les épreuves avec des cultures issues des colonies isolées.

Dans certains cas, très rares d'ailleurs, les souches fraîchement isolées n'agglutinaient avec aucun des sérums ; quelques passages successifs sur les milieux artificiels suffisaient pour les rendre agglutinables.

Enfin, pour effectuer rapidement les épreuves d'agglutination, nous avons employé la technique de Cooper qui consiste à se servir, pour la réaction, non pas de sérums monovalents, mais d'un mélange de sérums. On emploie donc le sérum monovalent du type 1 et les 8 mélanges suivants :

A-I;
 B-II + V;
 C-III + VIII;
 D-IV + VI ($a + b$) + VII + XVIII;
 E-IX + X + XX + XXIX + XI;
 F-XII + XIII + XIV + XV + XXX;
 G-XVI + XVII + XIX + XXI + XXII;
 H-XXIII + XXIV + XXV + XXVII + XXVIII;
 I-XXXI + XXXII.

Lorsqu'un de ces sérums polyvalents agglutine le germe isolé, une épreuve est effectuée avec tous les sérums entrant dans ce mélange.

Nous avons déterminé le type de 46 souches à l'aide des sérums monovalents et des mélanges polyvalents. Or, l'emploi des mélanges donne en général des résultats suffisamment précis et permet d'effectuer plus rapidement la différenciation sérologique des pneumocoques du groupe X.

c) DÉTERMINATION DE LA VIRULENCE DU GERME.

Des quantités décroissantes (10^{-1} à 10^{-8} cent. cubes) d'une culture de dix-huit heures sur sérum-bouillon ont été injectées dans le péritoine de souris blanches pesant de 16 à 20 grammes. La plus petite quantité de culture qui tuait la souris en soixante-douze heures était considérée comme dose minima mortelle.

d) EVALUATION DE LA QUANTITÉ D'ANTICORPS PRÉVENTIFS
DANS LE SÉRUM DES MALADES.

On prend 0 c. c. 1 de sérum du malade (quantité constante) dans un volume de 0 c. c. 5 ; on y additionne 0 c. c. 5 d'une dilution d'une culture de dix-huit heures d'une souche très virulente. Le mélange est introduit dans le péritoine de souris blanches pesant de 16 à 20 grammes. La plus grande dose de culture qui ne tuait pas la souris pendant quatre-vingt-seize heures servait à l'évaluation du pouvoir préventif. L'épreuve a été toujours pratiquée avec une souche du même type que le pneumocoque isolé des crachats des malades, mais jamais avec l'autoculture. Dans des cas nombreux, des épreuves parallèles ont été faites avec des pneumocoques de race différente.

Bactériologie des pneumonies de l'enfance.

Dans cette étude, notre intérêt étant porté exclusivement sur le pneumocoque, nous nous sommes servis, pour l'isolement du germe, de la méthode d'inoculation des crachats à la souris sans ensemencement préalable sur les plaques de gélose au sang. Le tableau I représentant les résultats de l'examen bactériologique des crachats, ne comprend que les germes isolés du sang des souris infectées. Dans nos recherches, le pneumocoque a été isolé dans 74 p. 100 des cas ; dans 4 p. 100 des cas nous avons trouvé le streptocoque hémolytique, le bacille de Friedländer et le staphylocoque hémolytique ; dans 22 p. 100 des cas, l'ensemencement du sang du cœur a été négatif ; ces cas ont été rangés dans le groupe des pneumonies bactériologiquement non diagnostiquées.

Dans un travail antérieur (Viktoroff, Dombrovskaja et Jero-fieeff), les crachats de 103 enfants atteints de pneumonie ont été soumis à l'analyse bactériologique par la méthode de l'inoculation à la souris avec ensemencement simultané sur gélose au sang : le pneumocoque a été isolé dans 73 p. 100, le streptocoque vert dans 16 p. 100, le streptocoque hémolytique dans 9 p. 100 et le staphylocoque dans 2 p. 100 des cas. En comparant ces données aux résultats obtenus par nous actuellement, on note avant tout la concordance dans le pourcentage des pneumocoques isolés dans les deux séries d'observations, les cas non diagnostiqués des analyses actuelles com-

TABLEAU 1. — Microbes isolés dans les pneumonies de l'enfance.

GERMES	PNEUMONIE lobaire franche aiguë		BRONCHOPNEUMONIE		TOTAL	
	Nombre de cas	Pourcentage	Nombre de cas	Pourcentage	Nombre de cas	Pourcentage
Pneumocoque.	85	84,0	175	70,4	260	74,3
Streptocoque hémolytique.	4	4,0	6	2,4	7	2,0
Bacille de Friedländer	2	2,0	3	1,2	5	1,4
Staphylocoque	1	1,0			1	0,3
Non diagnostiqués	12	12,0	65	26,0	77	22,0
	101	100,0	249	100,0	350	100,0

prenant, selon toute probabilité, les streptocoques hémolytiques et verts, avirulents pour les souris des auteurs cités plus haut. Ces derniers germes se rencontrant dans la gorge et la cavité buccale des enfants bien portants, il serait prématuré, en se basant sur les résultats de l'ensemencement, de leur attribuer un rôle étiologique dans les pneumonies de l'enfance. D'ailleurs, c'est une question qui demande à être approfondie.

De règle, nous avons toujours isolé des crachats une culture pure de pneumocoque ; dans deux cas, l'examen bactériologique des pièces d'autopsie a révélé la présence du pneumocoque et du pneumobacille de Friedländer, dénotant ainsi une infection mixte. Dans plusieurs cas, nous avons isolé, du pus des complications et des différents organes d'un même malade, un pneumocoque et un streptocoque hémolytique virulent.

Détermination du type du pneumocoque dans les pneumonies des enfants.

En nous servant de la technique décrite plus haut, nous avons effectué la différenciation sérologique de 260 souches de pneumocoque, isolées dans 85 pneumonies franches et

175 broncho-pneumonies. Nous avons réussi à déterminer le type de 233 souches, c'est-à-dire 98,5 p. 100. Trois souches, malgré des passages et des ensemencements répétés, n'agglutinaient avec aucun des sérums. Deux souches présentaient une agglutination de groupe, une avec les sérums des types VI et XXIX, l'autre avec les sérums des types X et XXIX ; les cultures-filles de ces souches, issues d'une colonie isolée, présentaient la même propriété. Il faut cependant noter que les sérums antipneumococciques du groupe X présentent souvent une agglutination avec des souches hétérologues ; c'est ainsi que les sérums des types VIII et III, V et II, XV et VII présentent souvent des agglutinations croisées ; les sérums X, XII, XIV, XVIII réagissent d'une manière plus ou moins intense avec les souches du type XXIX, VII, XXX et VII, les sérums VI (a + b), VII, XIX, XX, XXI, XXVIII et XXX avec les germes de différents types. Cependant, dans la grande majorité des cas, en choisissant des dilutions convenables des sérums et en faisant des passages successifs des pneumocoques isolés, on arrive à déterminer le type véritable du germe.

Dans la règle, nous avons toujours isolé, des crachats donnés, un seul type de pneumocoque. Cooper et ses collaborateurs, en examinant 136 souches isolées dans des pneumonies franches infantiles, constatent dans 13 cas des cultures mixtes à deux types et davantage ; le plus souvent on trouvait ensemble les types VI et XXVIII. Dans nos recherches, nous n'avons jamais rencontré dans les crachats deux types ou plus de pneumocoques : l'analyse sérologique soignée des souches présentant une agglutination de groupe, ainsi que l'épreuve d'agglutination effectuée avec les cultures-filles, issues d'une colonie isolée, nous ont toujours permis de déterminer le type véritable du germe.

Les résultats de notre étude sérologique ont montré que les 31 sérums de Cooper permettent de réduire à 0 la quantité de germes non différenciés.

Le diagramme I montre la fréquence de différents types de pneumocoques, isolés dans 254 cas de pneumonies (le cas n° 124, où nous avons isolé du sang le type IX et des crachats le type VIII, sera décrit en détail plus bas). Les types VI

et I se rencontrent le plus fréquemment (dans plus de 10 p. 100 des cas chacun) ; suivent, dans l'ordre de fréquence, les types III, II, XX et XIX (dans 9 p. 100 à 5 p. 100 des cas chacun). Les 6 types énumérés constituent 51,5 p. 100 de tous les germes isolés. Le groupe suivant est constitué par 8 types — XVIII, VIII, XIV, XXII, V, X, XVII et XXV — qu'on trouve dans 5 p. 100 à 3 p. 100 des cas, ce qui constitue 29,6 p. 100 des souches. Les types IV, VII, XV, XVIII, IX, XIII, XI, XII et XXI se rencontraient plus rarement (3 p. 100 à 1 p. 100) et ont été isolés, en somme, dans

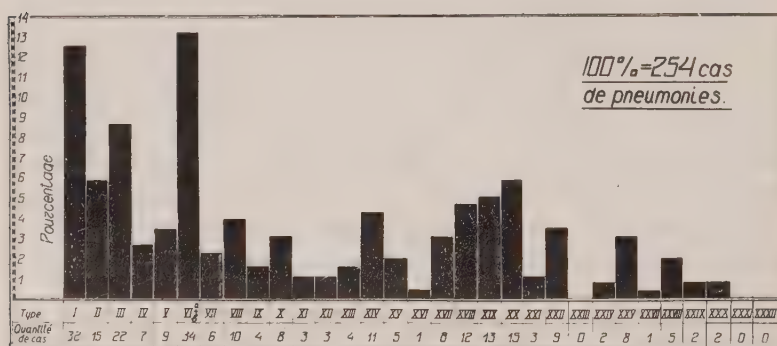


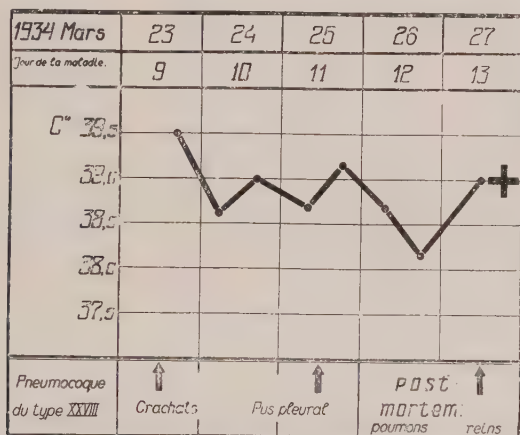
DIAGRAMME 1. — Fréquence de différents types de pneumocoques dans les pneumonies de l'enfance.

15,5 p. 100 des cas. Les autres races (XXIV, XXIX, XXX, XXVII et XVI) ont été diagnostiquées dans moins de 1 p. 100 des cas chacun, ce qui donne en somme 3,4 p. 100 de toutes les souches isolées. Enfin, pendant toute la durée de nos recherches, nous n'avons pas isolé les types XXIII, XXX et XXXII.

Parmi les 136 souches des pneumocoques du groupe X isolées dans les pneumonies de l'enfance, et différenciées par Cooper à l'aide de 29 sérums, les types VI, V et XIV ont été les plus fréquents. Plummer, Raia et Schultz ont constaté dans la première série de leurs observations, la prédominance des types VI et I dans les pneumonies franches des enfants. Les 140 souches étudiées ont été différenciées à l'aide de 13 sérums. Dans une deuxième série d'observations, en se

servant de 24 sérums, les mêmes auteurs ont constaté la prédominance des types XIV, I, VI, VII, IV et XVIII qui englobaient 46,4 p. 100 des 160 souches isolées. En comparant nos données aux résultats obtenus par les auteurs précités, nous constatons une concordance remarquable en ce qui concerne le type VI, qui prédomine dans toutes les séries d'observations ; quant aux autres races, des divergences notables peuvent être enregistrées entre nos données et celles des auteurs américains.

La fréquence des types de pneumocoque isolés dans les



*Pneumonie gauche avec abcès, pleurésie purulente
due au pneumocoque type XXVIII*

DIAGRAMME 2. — Enfant Hom... (J.), quatorze mois.

pneumonies de l'enfance peut varier, comme il sera montré plus bas, suivant la forme anatomique de l'affection, l'âge des enfants, et l'épidémie pendant laquelle les recherches ont été effectuées.

Preuves à l'appui du rôle étiologique des pneumocoques du groupe X dans les pneumonies de l'enfance.

Le fait est connu que les pneumocoques du groupe X se rencontrent souvent à l'état de saprophytes dans la gorge et la cavité buccale des gens bien portants.

TABLEAU II. — Examen bactériolo-

NUMÉRO D'ORDRE	NUMÉRO DU PROTOCOLE	CRACHATS		SANG		PUS PLEURAL		PUS D'OTITE et d'abcès	
		Type	Virulence (cent. cubes)	Type A	Virulence (cent. cubes)	Type	Virulence (cent. cubes)	Type	Virulence (cent. cubes)
1	2	VI				VI	10 - 7		
2	17	XIV	10 - 4						
3	25	XXVIII	10 - 5			XXVIII	> 10 - 2		
4	42	III							
5	83	XIV	10 - 3						
6	96	VI	10 - 2			—			
7	100	VI	10 - 4						
8	103	VI	10 - 2			II			
9	108	XXV	10 - 5						
10	116	XX	10 - 6						
11	120	XX	10 - 5						
12	124	VIII	10 - 7	IX	> 10 - 2	IX	> 10 - 2		
13	134	XXI	10 - 7						
14	158	XIX	10 - 2			XIX	10 - 2		
15	174	III							
16	175	XIV	10 - 2					XIV	
17	210	XVIII	10 - 6						
18	238	II							
19	246	I							
20	254	XIV	10 - 2						
21	255	I						I	

D'après les données de nombreux auteurs, plus de la moitié des gens bien portants (y compris les enfants) sont des porteurs de pneumocoques et surtout de germes du groupe X. Peut-on, dans ces conditions, considérer les pneumocoques du groupe X isolés des crachats des malades comme jouant un rôle étiologique incontestable dans la pathogénie des pneumonies de l'enfance ? Viktoroff, Dombrovskaja et Jerofeeff en ont déjà apporté des preuves dans une communication antérieure.

Toutefois, ces auteurs, n'ayant pas eu les moyens d'effectuer la différenciation sérologique des germes isolés, n'ont pas tiré de leur étude des conclusions définitives. Dans le travail présent, nous essayerons de combler ces lacunes.

Pour prouver le rôle étiologique des pneumocoques du groupe X, isolés des crachats des pneumonies, il faudrait dé-

même malade.

PIÈCES D'AUTOPSIE									
Pneumons		Rate		Reins		Foie		Méninges	
	Virulence (cent. cubes)	Type	Virulence (cent. cubes)	Type	Virulence (cent. cubes)	Type	Virulence (cent. cubes)	Type	Virulence (cent. cubes)
IV	10 - 4	—		Strep. hémol.					
III		—		XXVIII	10 - 5				
II		Strep. hémol.		Strep. emol.					
IV	10 - 3	Strep. hémol.		—					
		—		VI	10 - 2				
VI	10 - 4	Strep. hémol.		Strep. hémol.					
II		II		II					
V	10 - 6	—		—					
IX	10 - 7	XX	10 - 7	—		XX	10 - 7		
IX	10 - 8	—		—					
III	10 - 8	Bac. de Friedlander.		VIII	10 - 5				
XI	10 - 5	XXI	10 - 6	—		XXI	10 - 4		
		—		—		VI	10 - 2		
II	10 - 6	—		—					
VI		II		II					
XI	10 - 8	—		XI	10 - 8	XI	10 - 8		
Friedlander.								XIV	> 10 - 2

montrer : 1° leur pouvoir pathogène, c'est-à-dire leur pouvoir d'infecter l'organisme, d'envahir ses tissus et de s'y multiplier ; 2° montrer que ce germe se rencontre constamment dans cette affection, c'est-à-dire qu'on arrive à l'isoler dans tous les stades de la maladie ; 3° et enfin, prouver sa spécificité par la présence des anticorps spécifiques dans le sang de convalescents.

Nos recherches ont été dirigées dans ces trois voies.

Pour démontrer le pouvoir pathogène des germes isolés des crachats, nous avons examiné, comme il a été dit plus haut, parallèlement le sang des malades, le pus des complications et les pièces d'autopsie.

Le tableau II résume les résultats de ces recherches. Dans 18 cas sur 21, c'est-à-dire dans 84 p. 100 des cas, le diagnostic posé à la suite de l'analyse des expectorations a

TABLEAU III. — Examens répétés des crachats

NUMÉRO D'ORDRE	NUMÉRO du protocole	FORME ANATOMIQUE	PREMIER EXAMEN			DEUXIÈME EXAMEN		
			Jour de la maladie	Type	Virulence (cent. cubes)	Jour de la maladie	Type	Virulence
1	99	Bronchopneumonie.	6	XIV	$> 10^{-2}$	34	VI	10
2	106	Bronchopneumonie.	3	VI	$> 10^{-2}$	16		10
3	108	Bronchopneumonie.	8	—		16	XXV	10
4	110	Bronchopneumonie.	21	VI	10^{-8}	32		10
5	113	Bronchopneumonie.	7	III		14	XIII	10
6	118	Pneumonie lobaire.	3	I		9	I	10
7	127	Bronchopneumonie.	7	XXV	10^{-7}	13	XXV	10
8	129	Pneumonie lobaire.	6	XX	10^{-8}	12	XX	10
9	130	Bronchopneumonie.	15	XXIX	$> 10^{-2}$	22	XXIX	$> 10^{-2}$
10	132	Pneumonie lobaire.	5	I		11	I	10
11	135	Bronchopneumonie.	6	V	10^{-8}	13	V	10
12	164	Bronchopneumonie.	25	II		31	II	10
13	165	Bronchopneumonie.	10	V	10^{-8}	16	V	10
14	167	Bronchopneumonie.	25	XIX	10^{-2}	48	XIX	10
15	171	Bronchopneumonie.	28	VI	10^{-5}	35	VI	10
16	178	Bronchopneumonie.	6	XI	10^{-2}	13	XI	10
17	180	Bronchopneumonie.	9	XXVIII	10^{-6}	17		10
18	181	Bronchopneumonie.	4	III		12	VI	10
19	254	Bronchopneumonie.	7	—		24	XIV	$> 10^{-2}$
20	256	Bronchopneumonie.	14	III		21	III	10
21	262	Pneumonie lobaire.	4	VI	10^{-3}	10	VI	10
22	268	Pneumonie lobaire.	6	II		14	II	10
23	276	Pneumonie lobaire.	9	II		18	II	10
24	281	Bronchopneumonie.	7	XXVIII	$> 10^{-1}$	20	XXVIII	$> 10^{-1}$

été confirmé par l'examen du pus et des pièces anatomiques.

La courbe thermique et les données bactériologiques, tirées de l'observation d'un malade (enfant de quatorze mois mort à la suite d'une bronchopneumonie grave), peuvent servir d'illustration (v. diagramme II).

L'analyse bactériologique a été effectuée le neuvième jour : crachats ; le onzième jour : pus pleural ; dans les 2 cas, le pneumocoque du type XXVIII a été isolé ; le treizième jour, l'enfant a succombé. Le même pneumocoque a été trouvé dans les poumons et les reins.

Des examens répétés des crachats ont été faits afin de s'assurer que pendant toute la durée de la maladie le germe reste constant.

Le tableau III montre que dans 92 p. 100 des cas

ême malade durant toute la maladie.

TROISIÈME EXAMEN		QUATRIÈME EXAMEN			CINQUIÈME EXAMEN			JOUR de la convalescence ou de la mort
Type	Virulence (cent. cubes)	Jour de la maladie	Type	Virulence (cent. cubes)	Jour de la maladie	Type	Virulence (cent. cubes)	
VI	10 - 7	47	—	—				75
XXV	10 - 8	28	—	—				21
VI	10 - 6							Mort le 22 ^e jour.
								22
								25
								5
								14
								11
								22
								12
II		39	II		45	II		47
								51
								61
—		59	—		64	VI	≈ 10 - 3	59
XXVIII	10 - 8							Mort le 66 ^e jour.
								15
								63
XIV	> 10 - 2	41	—					40
III								Mort le 65 ^e jour.
VI	10 - 3							24
								7
								4
								20
								25

(les recherches ont porté sur 25 malades), le même type de pneumocoque a été isolé au début et durant la maladie.

Une discussion plus détaillée de ces données sera présentée plus loin.

Enfin, pour résoudre la troisième question concernant l'existence des anticorps spécifiques dans le sérum des convalescents, nous avons recherché les agglutinines et les anticorps préventifs correspondant au type du pneumocoque isolé des crachats.

Le tableau IV résume les résultats de ces expériences. Dans 61 p. 100 des cas (nous avons examiné le sang de 18 enfants), nous avons pu démontrer que le sérum des convalescents contient des substances spécifiques du type par rapport aux pneumocoques isolés des crachats.

Nous reviendrons sur ces résultats en parlant de l'immunité dans les pneumonies de l'enfance.

Les faits que nous venons de citer prouvent que les pneumocoques du groupe X, isolés des crachats, représentent sans aucun doute le facteur étiologique déterminant des pneumonies de l'enfance ; il ne s'agit sûrement pas de saprophytes, et les crachats, obtenus de la façon que nous avons décrite plus haut, constituent l'excrétion des voies respiratoires profondes.

Variations de la morbidité et types du pneumocoque suivant les saisons et les années.

La morbidité, parmi les enfants, varie d'une façon régulière suivant les saisons.

Le diagramme III est l'image graphique représentant la

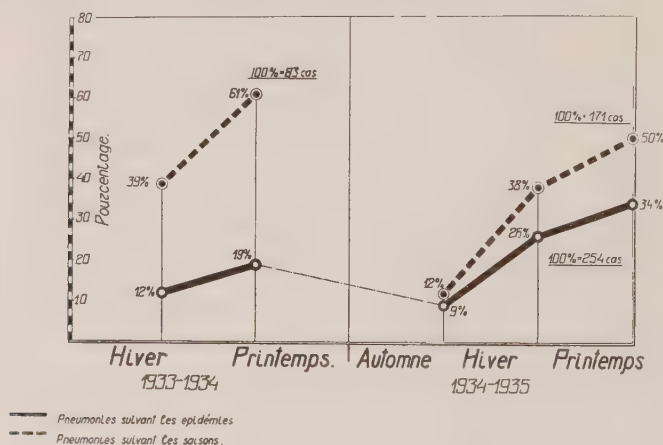


DIAGRAMME 3. — Oscillations épidémiques et saisonnières de la morbidité.

répartition, suivant les saisons, de 254 cas de pneumonies que nous avons observés pendant les années 1933, 1934 et 1935.

L'automne est la saison la moins frappée par la pneumonie ; la morbidité monte en hiver (en dépassant trois fois celle de l'automne) pour arriver à son maximum au prin-

TABLEAU IV. — Titre des anticorps du sang des enfants convalescents.

NUMÉRO D'ORDRE	NUMÉRO DU PROTOCOLE	FORME ANATOMIQUE	TYPE du pneumocoque agent de l'infection	ÂGE DU MALADE	EXAMEN du sérum		ANTICORPS PRÉVENTIFS		AGGLUTININES	
					Après jour de la maladie	Après la convalescence en jours	Souche étudiée	1 cent. cube de sérum préserve contre	Souche étudiée	Titre
1	98	Bronchopneumonie.	XIX	7 mois.	90	42	VI et XIV (1) VI VI	Abs.	XIX et V (contrôle).	Abs.
2	99	Bronchopneumonie.	VI	7 mois.	25	47		Abs.		
3	406	Bronchopneumonie.	VI	7 mois.	55	43		Abs.		
4	407	Bronchopneumonie.	VI	1 an 8 mois.	20	42		Abs.		
5	413	Bronchopneumonie.	XIII	5 ans.	7	44	XIII et III (2) VIII, IX et VI (3) XX XI et V (contrôle).	XIII-40 ³ Dlm.		
6	424	Bronchopneumonie.	VIII et IX	1 an 6 mois.	45	43		III-Abs.		
7	404	Bronchopneumonie.	XX	10 mois.	75	40		Abs.		
8	440	Bronchopneumonie.	XI	8 mois.	45	44		Abs.		
9	475	Bronchopneumonie.	XXII	1 an.	27	40	VI et XVIII (contrôle).	Abs.	V	1/10
10	262	Pneumonie lobaire.	VI	4 ans.	45	9		VI-40 ³ Dlm.		
11	270	Pneumonie lobaire.	XXV	44 ans.	25	48		XVIII-Abs.		
12	299	Bronchopneumonie.	V	8 ans.	46	4		40 ³ Dlm.		
13	300	Pneumonie lobaire.	VIII	5 ans.	40	6	VIII et III (contrôle).	Abs.	I	1/4
14	305	Pneumonie lobaire.	I	7 ans.	44	8		VIII-40 ³ Dlm.		
15	306	Pneumonie lobaire.	XX	40 ans.	44	7		40 ³ Dlm.		
16	309	Pneumonie lobaire.	VIII	42 ans.	43	7		40 ³ Dlm.		
17	313	Pneumonie lobaire.	XXI	7 ans 6 mois.	49	7	XX	40 ³ Dlm.		
18	314	Pneumonie lobaire.	XX	3 ans.	48	7		40 ³ Dlm.		

(1) Chez le malade n° 99, on a isolé des crachats; pour la première fois, le type IV; pour la deuxième et la troisième fois, le type VI. Les expériences ont été faites avec les deux types.

(2) Chez le malade n° 113, on a isolé pour la première fois, le type III; pour la deuxième fois le type XIII. Les expériences ont été effectuées avec les deux types.

(3) Chez le malade n° 424, on a isolé des crachats du type VIII; du sang et du pus, le type IX; le type VI a servi de contrôle.

temps avec des chiffres présentant le quadruple de ceux de l'automne.

Cette augmentation régulière de la courbe de morbidité, qui commence en automne pour atteindre son acmé au printemps, a été constatée par nous dans les épidémies de 1933-1934 et de 1934-1935.

La fréquence avec laquelle on rencontre les différents types de pneumocoques peut également varier suivant qu'on envisage le moment où l'analyse a été effectuée. Les variations des types peuvent être liées à l'épidémie elle-même ou encore à la saison de l'année.

En comparant la fréquence de différents pneumocoques du groupe X isolés des pneumonies infantiles, on constate que les pneumocoques des types XXVIII, IX, IV et XX ont été isolés dans l'épidémie de 1933-1934 : 9, 7, 3 et 2,7 fois plus souvent que dans l'épidémie de 1934-1935 ; de même, certaines races, XXVII et XXX par exemple, n'ont pas été trouvées pendant toute la durée de la deuxième épidémie. D'un autre côté, les pneumocoques des types I, VII, II, V, X et XXV ont été trouvés deux à trois fois plus souvent en 1934-1935 qu'en 1933-1934 ; pendant cette deuxième épidémie, nous avons isolé, pour la première fois, les races XV, XVI, XXI et XXIX, que nous n'avons pas rencontrées pendant l'épidémie précédente.

Enfin, comme nous l'avons dit plus haut, certains types de pneumocoques se rencontrent plus fréquemment pendant une saison de l'année que pendant les autres. Ainsi, les types XIV, XVIII, XIX et XXII ont été isolés, dans l'épidémie de 1934-1935, plus souvent pendant l'hiver, tandis que la majorité des pneumocoques des types I, II, XIII, V et XXV ont occasionné les pneumonies du printemps.

Les causes de ces variations saisonnières et annuelles de la morbidité et de la fréquence de différentes races de pneumocoques sont peu connues et demandent, pour être élucidées, des recherches approfondies. On peut toutefois supposer que des influences météorologiques, ainsi que des facteurs épidémiologiques, en constituent les causes principales.

Type du pneumocoque et forme anatomique des pneumonies.

Viktoroff, Dombrovskaja et Jerofeeff ont déjà signalé le rôle prépondérant que jouent les pneumocoques du groupe X dans l'étiologie des pneumonies lobulaires (bronchopneumonies) des enfants, contrairement aux pneumocoques des types I et II, provoquant surtout les pneumonies lobaires (franches). Les rapports constatés par ces auteurs entre les

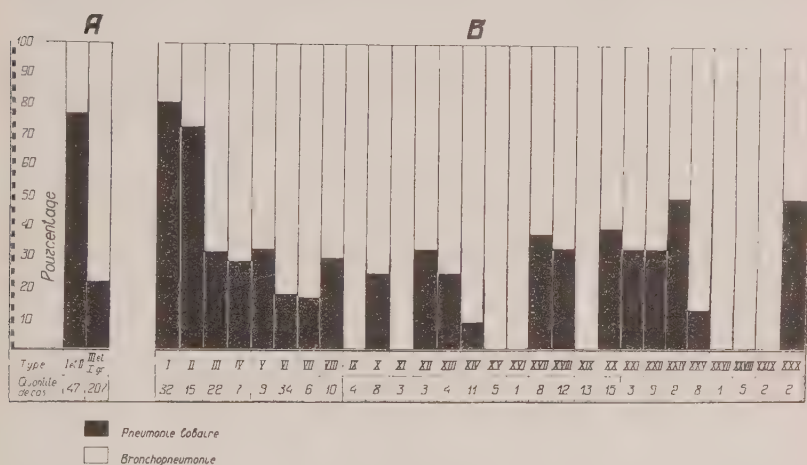


DIAGRAMME 4. — Fréquence de différents types et formes anatomiques des pneumonies.

types de pneumocoques et les formes anatomiques de la pneumonie ont été confirmés dans cette communication par des observations cliniques nombreuses, accompagnées d'une analyse sérologique de différentes races du groupe X.

Le diagramme IV montre l'interdépendance entre les différentes races des pneumocoques isolés et la forme anatomique de la pneumonie qu'ils ont occasionnée. On y voit que les types I et II déterminent, dans 77 p. 100 des cas, des pneumonies lobaires, et seulement dans 23 p. 100 ils provoquent des pneumonies lobulaires ; c'est le contraire que nous observons pour les pneumocoques du type III et les germes du groupe X ; ils déterminent, dans 78 p. 100 des cas, des pneu-

monies lobulaires, et seulement dans 22 p. 100 des pneumonies lobaires. Une étude détaillée a permis de constater qu'il n'y a pas lieu de faire une distinction entre l'action des pneumocoques des types I et II, tous les deux provoquant des pneumonies franches. Quant aux variétés entrant dans le groupe X et au type III, on les isole dans les pneumonies lobaires aussi bien que dans les bronchopneumonies ; cependant, les pneumocoques des types XIX, XV, XXVIII, IX, XI et XXIX ont été trouvés exclusivement dans les formes lobulaires, les autres types se rencontraient avec une fréquence plus ou moins grande (de 9 à 50 p. 100 des cas) dans les pneumonies lobaires : telles les races XIV, XXV, VII, VI, XIII, X, IV, VIII, III, V, XII, XVIII, XXI, XXII, XXIV et XXX (les types sont énumérés par ordre de fréquence).

Il est difficile de dire quelles sont les causes qui, suivant le type du germe, déterminent l'apparition de telle forme ou autre de la pneumonie ; on peut toutefois affirmer que parmi les facteurs dépendant du macro-organisme, l'âge du sujet joue un rôle incontestable ; ce que nous essayerons de prouver plus loin.

Type du pneumococque et âge du malade.

Les recherches sur l'interdépendance entre la forme anatomique de la pneumonie et l'âge de l'enfant, montrent qu'avant trois ans nous rencontrons presque exclusivement des bronchopneumonies (avant un an, dans 100 p. 100 des cas ; de un à trois ans, dans 86 p. 100 des cas). Par contre, chez les enfants plus âgés (après trois ans) ce sont les pneumonies franches qui prédominent.

En analysant la répartition des différents types de pneumocoques, par rapport à l'âge, dans les différentes formes anatomiques, nous constatons que dans les pneumonies franches, les pneumocoques des types I, VIII, XVII, XVIII, XXII, II, III, XX ont été isolés presque exclusivement chez les enfants plus âgés (après trois ans dans 100 p. 100 à 84 p. 100) : les pneumocoques des types V, IV, VI et X ont été rencontrés avec une fréquence plus ou moins grande chez les enfants

âgés de un à trois ans. Dans les bronchopneumonies qui frappent quelquefois les enfants de cet âge, on trouve surtout les types XIII, XXIX, VIII, V, XI, XXV (de 7 p. 100 à 67 p. 100). La plus grande quantité de races déterminant cette forme de pneumonie a été isolée avec une fréquence plus ou moins égale chez les nourrissons et chez les enfants de un à trois ans.

Formes cliniques et détermination du type de pneumocoque.

Y a-t-il dépendance entre le type du pneumocoque et l'évolution clinique de la maladie ? Cette question a été vivement débattue par beaucoup d'auteurs. Viktoroff, Semtzowa et Ettinger ont constaté que la pneumonie franche de l'adulte, causée par le pneumocoque du type I, présente une marche typique avec début soudain, ascension brusque de la température, qui se maintient au même niveau (courbe en plateau) pendant la période d'état et se termine par une chute non moins brusque ; les pneumonies franches, dont l'agent causal est le pneumocoque du type III, évoluent le plus souvent d'une façon atypique ; leur début est lent et progressif, la courbe thermique présente le type rémittent ou intermittent, la défervescence se fait en lysis. Les pneumocoques du type II et ceux du groupe X déterminent des pneumonies dont l'évolution offre un caractère intermédiaire. Viktoroff, Zemtzowa et Masel, en étudiant la bactériémie au cours des pneumonies de l'adulte, différencient, au point de vue de la pathogénie, deux formes cliniques : une forme toxique, évoluant sans bactériémie et caractérisée surtout par des symptômes d'intoxication générale ; l'autre forme septique ou septico-pyémique, accompagnée d'une bactériémie et présentant souvent des complications purulentes qui dominent le tableau clinique. Cette classification a été appliquée aux pneumonies infantiles par Viktoroff, Dombrowskaia et Jerofoeff. Ces auteurs ont décrit, dans les pneumonies de l'enfance, trois formes cliniques essentielles : une forme localisée, une forme toxique et une forme septique, des formes intermédiaires à

signes d'intoxication peu marqués et des formes toxico-septiques s'observent assez souvent.

Dans la forme localisée, l'évolution est en général bénigne, le processus morbide se limite (exclusivement) aux poumons, sans influencer d'une manière sérieuse l'état général. La forme toxique est caractérisée par des symptômes d'intoxication générale, des troubles nerveux, vaso-moteurs, gastro-intestinaux et urinaires.

Dans les formes toxico-septiques, à côté des symptômes d'intoxication apparaissent des signes de septicémie accom-

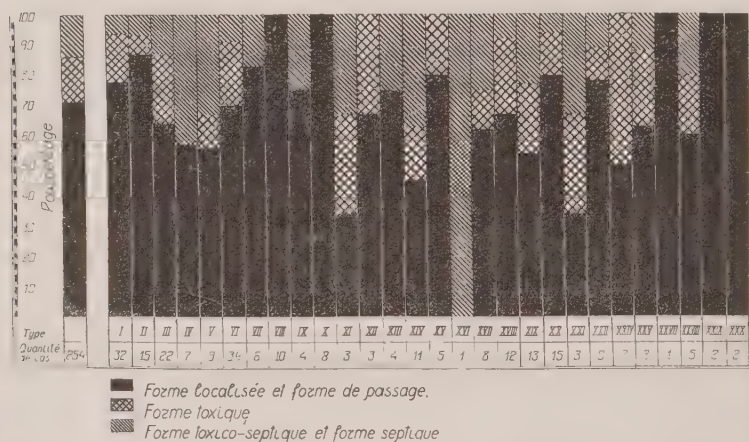


DIAGRAMME 5. — Type du pneumocoque et formes cliniques de la pneumonie.

pagnés des lésions purulentes. Dans cette catégorie de pneumonies, à côté des formes septiques foudroyantes les plus graves, on rencontre aussi des formes de gravité égale, à début brusque et suivies à bref délai de lésions de différents organes ; elles entraînent une mort rapide.

Essayons d'analyser nos observations cliniques au point de vue de l'interdépendance entre le type de pneumocoque et l'évolution de l'affection qu'il provoque (v. diagramme V).

Les pneumonies localisées ou intermédiaires ont été trouvées dans 71 p. 100 des cas ; dans 15 p. 100 des cas nous avons constaté des formes toxiques et 14 p. 100 évoluaient avec des symptômes toxico-septiques ou septiques.

Toutefois, l'évolution clinique de la pneumonie varie suivant le type du pneumocoque qui les provoque. Ainsi les types VIII, X, XXIX et XXX semblent occasionner exclusivement des pneumonies localisées sans donner des signes toxiques ou septiques. Les types II, VII, XX, XV, I, XXII, IX et VIII provoquent également, dans la plupart des cas, (87 p. 100 à 75 p. 100) des pneumonies localisées. Les types XXVIII, IV, V, XIX, XI, par contre, causent rarement des pneumonies localisées (60 p. 100 à 45 p. 100 des cas).

La fréquence des formes toxiques varie également suivant le type du germe (66 p. 100 à 6 p. 100 des cas). Les races XVIII, XIX, III, VI, XV, XIV et I ont été isolées le plus souvent dans les pneumonies toxiques (25 p. 100 à 1 p. 100) ; jamais celle-ci n'a été occasionnée par les types IV, VII, IX et XIII.

Quant aux formes septiques, elles sont dues, dans la plupart des cas, aux races IV, XIV, V, XIII, XVII et XIX (43 p. 100 à 2 p. 100) ; beaucoup plus rares (9 p. 100 à 6 p. 100) sont les formes septiques causées par les types VI, XVIII, XX et I.

Toutefois, en analysant les observations dont nous venons de parler, on ne peut passer outre l'âge des malades. L'analyse de la corrélation entre les formes cliniques et l'âge des enfants montre que les formes localisées s'observent surtout chez les enfants plus âgés (après trois ans, 85 p. 100 des cas) ; chez les enfants du premier âge (au-dessous de trois ans), les formes toxiques sont deux fois et les formes septiques trois fois plus fréquentes.

Rapports entre le type du pneumocoque et la fréquence de différentes complications.

Le tiers environ des pneumonies étudiées par nous (32 p. 100) a évolué avec complications. La fréquence et la gravité de ces complications varient suivant le type du pneumocoque en cause. Le maximum de complications (50 p. 100 et plus) a été observé dans les pneumonies provoquées par les types XI, XXVIII, IV, XIV et X ; suivent, en fréquence décroissante (de 44 p. 100 à 25 p. 100), les pneumonies dont l'agent causal est représenté par l'un des types V, XIX, XXV, III, VI, XX, II, XVII et XVIII ; les complications sont plus rares avec les races

I, XXII, VII (22 p. 100 à 16 p. 100); elles manquent totalement dans les pneumonies à types VIII, XV, XXIV et XXIX.

Cependant, la fréquence des complications dans les pneumonies causées par un type donné de pneumocoque ne va pas toujours de pair avec la gravité de l'infection. Assez souvent, les formes localisées se compliquent d'otites (qui, d'ailleurs, peuvent être occasionnées par des germes autres que le pneumocoque), de pleurésie sèche ou avec épanchement, etc., sans que ces complications influencent sérieusement l'état général des malades.

Dans les pneumonies septiques, les complications souvent multiples aggravent singulièrement le tableau clinique (empyèmes, méningite, ostéomyélite, péricardite purulente). Dans le diagramme XII, nous avons montré le rapport entre le nombre total (calculé en pourcentage) de pneumonies compliquées et la quantité de complications septiques (également évaluées pour 100 cas). On y voit que le nombre (100) des complications septiques est en général inférieur, quelquefois même de beaucoup, à la quantité totale des pneumonies compliquées; ainsi, les types X, VI, III et XX qui provoquent fréquemment des pneumonies compliquées, ne causent que rarement des complications septiques.

Quant à la fréquence des complications septiques, suivant les races des pneumocoques, nous en avons déjà parlé plus haut.

Parmi les complications que nous avons eu l'occasion d'observer, les otites occupent la première place; suivent les empyèmes, les pleurésies séreuses et fibrineuses, les pyélites, les méningites, les ostéomyélites et les péricardites purulentes. Nous n'avons pas pu enregistrer aucun parallélisme entre le type du pneumocoque et la localisation des complications septiques ou autres dans les pneumonies des enfants.

Type du pneumocoque et durée de la maladie.

En étudiant la durée de la pneumonie par rapport aux types de pneumocoques qui ont provoqué la maladie, nous constatons d'abord la différence entre la durée des pneumonies

franches et celle des bronchopneumonies (nous n'avons tenu compte que des sujets guéris sans complications). Tandis que les premières se terminent, dans la majorité des cas (74 p. 100), en dix jours, le nombre de pneumonies évoluant en vingt jours étant minime, les bronchopneumonies, au contraire, se caractérisent par leur marche lente ; dans plus de 50 p. 100 des cas elles se terminent après vingt jours, et les enfants guéris en dix jours sont d'une rareté extrême.

Il n'y a pas de corrélation entre le type du pneumocoque et la durée de la pneumonie franche qu'il occasionne. Dans les bronchopneumonies, la durée de l'affection peut varier suivant le type. Les bronchopneumonies à types VIII, V et XX se terminent généralement avant vingt jours, les maladies à pneumocoques des types XIX, XVII et III traînent souvent trente jours et plus ; les pneumonies causées par d'autres types évoluent en général en dix à trente jours.

La léthalité dans les pneumonies de l'enfance.

En analysant les données concernant la léthalité dans les pneumonies infantiles, il faut tenir compte des facteurs liés au micro et au macro-organisme, ceux-ci influençant dans une certaine mesure la dynamique de la léthalité. Ce sont les conditions qui déterminent le degré de résistance de l'organisme : l'âge, le facteur constitutionnel, l'alimentation, les conditions sociales et hygiéniques ; et, d'autre part, l'évolution clinique et la forme anatomique de l'affection ; le type et la virulence du germe infectant peuvent jouer un rôle dans la terminaison de la maladie, enfin la léthalité peut aussi varier suivant les saisons et les épidémies.

Léthalité suivant l'âge, les formes cliniques et anatomiques de l'affection.

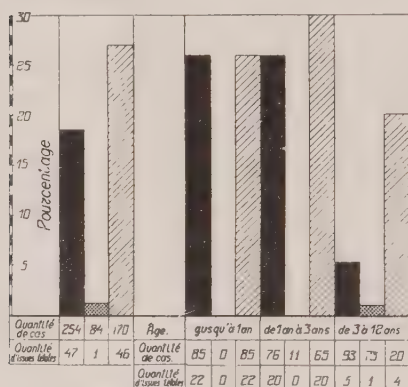
Sans discuter à cette place les conditions qui déterminent la résistance plus ou moins grande du macro-organisme (l'analyse en sera donnée dans la communication des cliniciens

ayant collaboré à ce travail), nous nous arrêterons seulement sur le rôle que jouent l'âge et les formes anatomiques et cliniques dans la terminaison fatale de la maladie.

La léthalité, comme on le voit dans les diagrammes VI et VII, étant égale à 48,5 p. 100, au total, présente des variations notables suivant la forme anatomique ; de 27 p. 100 dans les bronchopneumonies, elle tombe à 1 p. 100 dans les pneumonies franches. Elle varie encore davantage suivant les formes

la forme anatomique
de la maladie.

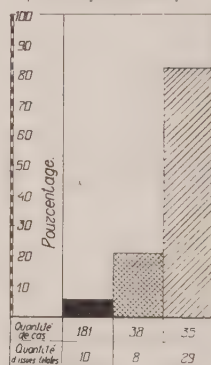
l'âge des malades



■ Lésion en général
 ▨ Lésion dans les pneumonies lobaires.
 ▩ Lésion dans les bronchopneumonies

DIAGRAMME 6. — Léthalité dans les pneumonies ci-dessus.

/Bronchopneumonies/



Formes cliniques
 ■ localisée et de passage
 ▨ toxique
 ▩ toxico-septique et septique

DIAGRAMME 7. — Léthalité dans les pneumonies et formes cliniques de la maladie.

cliniques : les formes toxico-septiques et septiques se terminent par la mort dans 83 p. 100 des cas ; dans les formes toxiques, l'issue fatale se rencontre dans 21 p. 100 des cas ; les formes localisées sont les plus bénignes, la mort n'y survient que dans 5,5 p. 100 des cas.

Quant à l'influence de l'âge, on constate que la léthalité, qui est très grande chez les enfants du premier âge (au-dessous de trois ans elle atteint le chiffre de 26 p. 100), tombe brusquement chez les enfants plus âgés (5 p. 100). Ces variations de la léthalité suivant l'âge, s'expliquent par la fréquence différente des bronchopneumonies et des pneumonies franches

suivant l'âge des enfants. Le rapport entre les pneumonies franches et les bronchopneumonies est, chez les enfants âgés de moins de trois ans, de 1/14 ; chez les enfants ayant dépassé cet âge, il est de 4/1. Viktoroff, Dombrowskaia et Jerofeef avaient constaté les variations suivant l'âge, dans les limites d'une forme anatomique donnée. C'est ainsi que dans les bronchopneumonies la léthalité atteint, d'après ces auteurs, 68 à 70 p. 100 chez les enfants n'ayant pas dépassé un an ; elle tombe à mesure que l'enfant avance en âge pour descen-

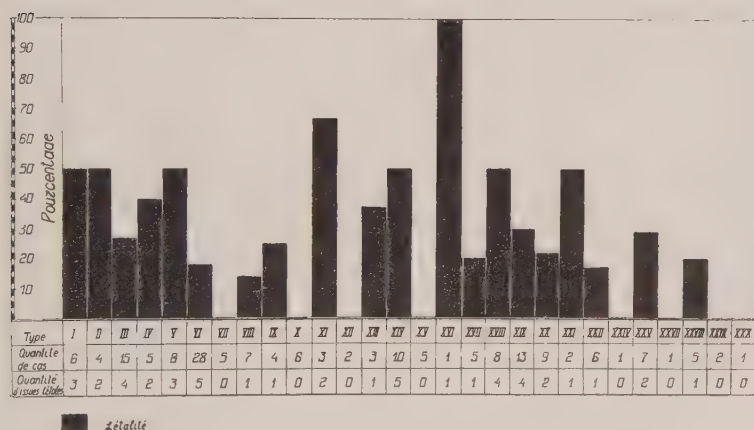


DIAGRAMME 8. — Léthalité dans les bronchopneumonies suivant le type du pneumocoque.

dre à 16 et 20 p. 100, chiffre qui dépasse de peu celui des adultes.

Dans cette série d'observations (voir diagramme XIV), nous n'avons pas pu confirmer ces données, les variations de la léthalité suivant l'âge ayant été insignifiantes dans le groupe des bronchopneumonies.

Léthalité et type du pneumocoque.

L'évolution des bronchopneumonies (voir diagramme VIII), causées par les pneumocoques des types VII, X, XV, VII et XXIX, est la plus bénigne, n'aboutissant jamais à une termi-

naison fatale ; la léthalité dans les pneumonies à types VIII, XXII, VI, XVII et XXVIII est de 14 à 20 p. 100 ; elle est encore plus grande (20 à 30 p. 100) dans les pneumonies provoquées par les races XX, IX, III, XXV et XIX, enfin les types IV, I, II, V, XIV, XVIII et VI entraînent la mort dans 40 à 50 p. 100 des cas.

En comparant ces données à celles qui caractérisent la marche de l'infection suivant le type du pneumocoque (voir diagramme X), on constate une concordance parfaite ; en effet, les types occasionnant ces formes localisées donnent une léthalité minime ; d'autre part, les types qu'on rencontre le plus souvent dans les pneumonies septiques et toxico-septiques déterminent une léthalité maxima.

Il faut cependant noter que les types I et II qui engendrent des pneumonies franches à évolution en général bénigne, donnent des bronchopneumonies à terminaison souvent fatale.

Quant à la virulence du germe, on ne peut pas affirmer qu'à elle seule elle pourrait influencer la léthalité dans les pneumonies.

Variations annuelles et saisonnières de la léthalité.

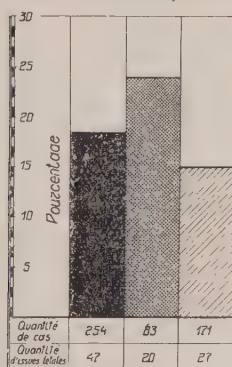
Les variations de la léthalité dépendent, d'une part, de l'épidémie (variations annuelles) et, d'autre part, de la saison (variations mensuelles) [voir diagramme IX]. Ainsi, la léthalité, pendant l'épidémie de 1933-1934, était une fois et demie plus forte qu'en 1934-1935 (calculs faits en pourcentage). Plus grande est encore la différence entre la léthalité totale des années 1933-1935 (18 p. 100) et celle (40 p. 100) des années 1931-1932 (Viktoroff, Dombrovskaia, Jerofeeff.)

Des variations régulières de la léthalité ont été constatées également suivant les saisons de l'année (voir diagramme XVII), dans l'épidémie de 1934-1935. Les terminaisons fatales sont rares au printemps ; elles augmentent du double en automne pour atteindre leur maximum en hiver (exprimée en pourcentage, la léthalité est quatre fois plus grande en hiver qu'au printemps). Des variations analogues de la léthalité, un peu moins accentuées, il est vrai, ont été constatées dans l'épidémie de 1933-1934.

En comparant la courbe de la léthalité saisonnière avec celles de la morbidité (voir diagramme III), on voit qu'elles vont en sens inverse : la morbidité est plus haute au printemps tandis que la léthalité, dans cette saison, est, au contraire, faible.

Quelle est la cause des variations saisonnières de la léthalité dans les pneumonies ? Il est certain que la léthalité, aussi bien que la morbidité dans les pneumonies sont influencées par des facteurs nombreux et variés, dont l'étude est encore à faire. Toutefois, la léthalité peut dépendre, dans une cer-

Léthalité suivant les épidémies



■ Léthalité en général
 ■ Léthalité en 1933-1934
 ■ Léthalité en 1934-1935

Léthalité suivant les saisons.

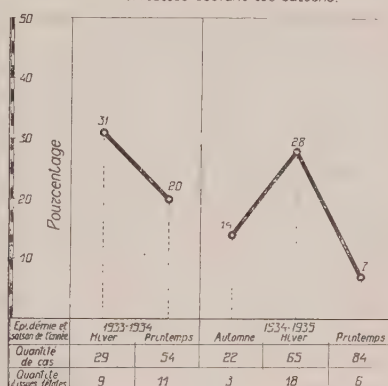


DIAGRAMME 9. — Oscillations épidémiques et saisonnières de la léthalité.

taine mesure, des formes cliniques de la pneumonie. En effet, en 1933-1934, le rapport entre les pneumonies franches et les bronchopneumonies que nous avons observées était de $1/3$; il était de $1/14$ en 1934-1935 ; la léthalité, dans le premier cas, constituait 24 p. 100 et dans le second 13 p. 100. La répartition des formes anatomiques dépend aussi des saisons : en 1934-1935, les rapports entre les pneumonies franches et les bronchopneumonies étaient, au printemps, de $1,3/1$, en automne de $1/1,8$, en hiver de $1/3,6$; en 1933-1934, ce rapport était, au printemps de $1/4,4$, en hiver de $1/6$. Donc, les bronchopneumonies sont beaucoup plus fréquentes en hiver, tandis

que les pneumonies franches prédominent au printemps. On comprend que la grande différence qu'on constate dans l'évolution clinique de ces deux formes anatomiques, jointe à la prédominance de l'une d'elles dans une saison donnée, puisse influencer la courbe de la léthalité.

Les causes qui déterminent la prédominance d'une forme anatomique suivant la saison nous sont inconnues.

Les variations annuelles de la léthalité ne sont pas liées aux variations du type et de la virulence du germe occasionnant la pneumonie.

En examinant le diagramme V, représentant la fréquence de différents types suivant les saisons, et le diagramme XVI, montrant la léthalité dans les broncho-pneumonies suivant les types de pneumocoques, on n'arrive pas à établir une corrélation entre la léthalité dans une saison donnée et les types de pneumocoques isolés dans la même saison ; il n'y en a pas non plus entre les variations saisonnières de la léthalité et la virulence des germes isolés dans différentes saisons (voir plus bas).

Examen du sang, du pus des complications et des pièces d'autopsie.

Ont été soumis à l'examen bactériologique, outre les crachats, le sang, le pus des complications et les pièces d'autopsie.

Examen du sang. — Parmi les 22 examens du sang qui ont été effectués, un seul a été positif (N° 124), c'est-à-dire 4,5 p. 100. Sans aucun doute, ce chiffre ne reflète pas la fréquence véritable de la bactériémie dans les pneumonies de l'enfance. Viktoroff, Dombrovskaja et Jerofeeff ont recherché le pneumocoque dans le sang de 33 enfants atteints de broncho-pneumonie. Le germe a été trouvé six fois, c'est-à-dire dans 18 p. 100 des cas. Wollstein a obtenu un seul résultat positif sur 11 analyses faites en cas de pneumonies lobaires. Lyon a isolé le pneumocoque du sang dans 6 cas sur 43 pneumonies franches (14 p. 100) et dans 3 sur 11 broncho-pneumonies (27 p. 100). Plummer, Raia et Schultz, en examinant le sang

de 99 enfants atteints de pneumonies lobaires et lobulaires, ont trouvé le pneumocoque seulement dans 6 p. 100 des cas.

Les résultats discordants obtenus par les auteurs s'expliquent dans une certaine mesure par les faits suivants: d'abord, dans les bronchopneumonies surtout, l'évolution de la maladie étant de longue durée, et le germe pouvant apparaître dans le sang à différentes périodes, un seul ensemencement du sang est insuffisant pour nous donner un résultat définitif; pourtant, des ensemencements multiples se heurtent à des difficultés techniques très grandes, surtout chez les tout-petits.

Il est donc beaucoup plus difficile de trouver le pneumocoque chez les petits enfants que chez les adultes.

Le pus des empyèmes, des otites, des abcès contient le pneumocoque dans 61 p. 100 des cas. Celui-ci présente chez le même malade des propriétés sérologiques et une virulence identiques à celles du pneumocoque isolé des crachats.

Examen des pièces anatomiques. — Nous avons autopsié 31 enfants morts de pneumonie. Dans 17 cas (55 p. 100), le pneumocoque a été trouvé dans les viscères; le type sérologique et la virulence correspondaient, dans la grande majorité des cas, au type et à la virulence des pneumocoques isolés des crachats du même malade.

Virulence des pneumocoques du groupe X.

La virulence des pneumocoques du groupe X isolés des pneumonies infantiles sera étudiée dans une communication ultérieure. Dans ce travail, nous n'aborderons cette question que pour éclaircir le rôle que joue la virulence du germe dans la pathogénie, l'évolution et la terminaison de la maladie.

152 souches de pneumocoques de races différentes ont été étudiées au point de vue de leur virulence. 47 p. 100 se sont montrées peu virulentes: leur Dlm était égale à $10^{-1.40-3}$ cent. cubes d'une culture de dix-huit heures; 15 p. 100 de souches étaient virulentes: leur Dlm était égale à $10^{-4.40-6}$ cent. cubes de culture; 38 p. 100 étaient très virulentes: leur Dlm était égale à $10^{-7.40-8}$ cent. cubes de culture.

Toutefois, dans chaque race, la quantité de souches de différente virulence n'était pas la même. Certains types étaient peu virulents, d'autres se distinguaient par une haute virulence ; parmi les troisièmes, tous les degrés de virulence ont été observés. Le degré de virulence paraît être constant pour chaque type.

Examens répétés des crachats durant la maladie.

Le but de cette investigation était : 1° de prouver que le type du pneumocoque isolé des crachats reste constant durant la maladie ; 2° d'étudier les variations de la virulence du germe pendant la période d'état et la convalescence.

Des examens répétés des crachats ont été effectués dans 23 cas, dont 6 atteints de pneumonie franche et 19 de broncho-pneumonie. L'analyse a été répétée de deux à cinq fois. La durée de l'observation était de six à trente-neuf jours. Les résultats de ces recherches sont représentés dans le tableau IV, dont nous avons déjà parlé. Or, nous avons constaté que chez 92 p. 100 des malades, les pneumocoques isolés des crachats à différentes périodes de l'affection sont identiques au point de vue de leur type, et, dans la grande majorité aussi, au point de vue de leur virulence ; même pendant la convalescence, la virulence ne subit pas de variations considérables.

On peut donc affirmer que le type sérologique du germe aussi bien que la virulence restent à peu près constants pendant toute la durée de l'infection. Ceci est confirmé dans une certaine mesure par les deux observations suivantes :

Observation I. — Nous avons isolé des crachats d'un petit malade (obs. 62/99), des pneumocoques du type IV peu virulents ; trois mois et demi après, l'enfant tombe de nouveau malade. Cette fois c'est le type VI très virulent qu'on a isolé.

Observation II (101/139). — L'enfant est admis pour une pneumonie, on isole un pneumocoque du type XX peu virulent. A la deuxième admission, la pneumonie a été causée par un pneumocoque très virulent du type XVIII.

On voit donc qu'un même enfant peut être atteint plusieurs fois de pneumonies à types différents et de virulence inégale.

Examen immunologique des convalescents.

Au cours de nos investigations sur la pneumonie des enfants, nous avons aussi recherché dans le sang des convalescents des anticorps spécifiques pour chaque type donné, dans le but d'établir : 1° le rôle étiologique des pneumocoques, isolés des crachats, et 2° la signification de l'âge dans l'apparition de l'immunité post-infectieuse. Les convalescents âgés de sept mois à douze ans, que nous avons examinés à ce point de vue, ont guéri soit des bronchopneumonies, soit des pneumonies franches. Le sang a été examiné du quatrième au dix-huitième jour de la convalescence, selon la méthode citée plus haut. Les résultats de cette étude sont groupés dans le tableau V.

Les anticorps spécifiques (anticorps préventifs et agglutinines) ont été constatés dans 61 p. 100 des cas (11 enfants sur 18). Leur spécificité était exclusive, en ce sens que les réactions d'immunité ont exclusivement eu lieu en présence des germes dont le type correspondait à celui des crachats. Les sérums des enfants n'avaient aucun pouvoir préventif ou agglutinant par rapport au type hétérologue.

Ainsi, dans l'observation n° 262, nous voyons que les anticorps du sérum étaient exclusivement actifs en présence du type VI, isolé des crachats. Leur action était nulle sur le type XVIII qui servait de contrôle. Cependant, dans l'observation n° 300, nous trouvons que le sérum de convalescent réagissait avec le type VIII, agent causal de la maladie, isolé des crachats, aussi bien qu'avec le type hétérologue III qui a servi de contrôle. Ce fait dénote une certaine parenté de ces germes, fait d'ailleurs constaté par d'autres auteurs. D'un grand intérêt sont encore les résultats de l'examen sérologique, que nous trouvons dans l'observation n° 113. L'examen bactériologique répété des crachats a révélé, pour la première fois, le pneumocoque du type III ; pour la deuxième fois, le type XIII ; en recherchant pendant la convalescence les anticorps spécifiques dans le sang, nous avons constaté que celui-ci ne contenait que des anticorps pour le type XIII,

résultat qui a permis de déterminer l'agent causal de l'affection. Ces données prouvent le rôle étiologique incontestable du pneumocoque dans les pneumonies de l'enfance.

La deuxième question que nous nous sommes posée concernait l'influence de l'âge dans l'apparition de l'immunité post-infectieuse. Or, chez les tout petits enfants guéris de pneumonie, nous n'avons jamais trouvé d'anticorps spécifiques dans le sang ; ils ont été, par contre, constatés dans le sérum des enfants de trois à douze ans, convalescents de pneumonies franches ou de bronchopneumonies. Toutefois, la quantité d'anticorps chez les enfants est insignifiante : 1 cent. cube de sérum d'un convalescent de pneumonie franche prémunit la souris contre 10^2 à 10^5 Dlm, tandis que 1 cent. cube de sérum d'adulte guéri de la même maladie, préserve l'animal contre 10^6 à 10^7 Dlm de la culture homologue.

Donc, les enfants du premier âge ne présentent pas d'aptitude à produire des anticorps ; cette propriété n'apparaît que chez les enfants plus âgés pour atteindre son maximum chez les adultes.

La présence des anticorps préventifs, du moins chez les animaux d'expérience, est une des propriétés essentielles de l'immunité anti-pneumococcique. Il faut cependant noter que cette présence n'est pas de rigueur, l'animal pouvant être immun sans contenir d'anticorps dans le sang (expériences de Tillet sur le lapin, Viktoroff et Ostrovskaia sur la souris). Nous ne croyons donc pas possible de nier la présence de l'immunité post-infectieuse chez les enfants du premier âge, même au cas où les anticorps spécifiques font défaut dans le sang.

Rôle des germes microbiens et de l'organisme dans la pathogénie, l'évolution clinique et la terminaison des pneumonies de l'enfance.

Toute infection est occasionnée par des facteurs dépendant du micro- et du macro-organisme ; le caractère de cette interdépendance et les conditions dans lesquelles l'infection a lieu déterminent, dans une certaine mesure, l'évolution clinique et la terminaison de la maladie.

Pour faire l'étude pathogénique des pneumonies de l'enfance, il faudrait donc analyser les facteurs dépendant du germe causal et ceux qui sont liés à l'organisme infecté. C'est à ce point de vue que nous allons envisager les pneumonies de l'enfance.

Nous appelons virulence la propriété du germe de vaincre la résistance de l'organisme, d'envahir ses tissus, de s'y multiplier.

C'est en se basant sur cette conception que Robertson et Cornwell considèrent la virulence du pneumocoque pour la souris comme étant l'expression de la virulence pour l'homme. Or, d'après nos données, ce facteur ne joue pas de rôle prépondérant dans le développement des pneumonies infantiles. En effet, nous avons eu l'occasion de montrer que la moitié à peu près des germes isolés des crachats pneumoniques appartiennent à des races pas ou peu virulentes.

Le tableau IV (résumant les résultats des analyses bactériologiques multiples des crachats) permet de constater que la faible virulence des souches isolées est une propriété constante, la virulence des germes isolés durant la maladie restant à peu près au même niveau. (Obs. 130, 167, 178, 262, 254 et 284).

Le rôle étiologique des pneumocoques de faible virulence dans les pneumonies de l'enfance apparaît encore plus démonstratif à l'examen du tableau III ; chez plusieurs malades (N^{os} 83, 96, 124, 158, 175, 254), nous avons isolé du sang, du pus des complications et des pièces d'autopsie, des types différents de pneumocoques à très faible virulence ; de règle, la virulence de ces germes correspondait à la virulence des pneumocoques isolés des crachats.

La virulence du pneumocoque ne peut donc être considérée comme un facteur déterminant le développement des pneumonies des enfants ; les pneumonies des adultes sont par contre occasionnées, dans la majorité des cas, par des germes très virulents (Whittle).

De plus, nous pouvons affirmer que la virulence est sans influence aucune sur la terminaison de l'infection.

Le tableau III nous a déjà convaincus que les souches peu virulentes déterminent souvent des pneumonies à issue fatale. Enfin, lorsqu'on examine à ce point de vue nos obser-

vations, on ne tarde pas à voir que la léthalité dans les pneumonies ne présente pas non plus de variations notables (voir diagramme X), suivant la virulence des germes. Nous avons montré plus haut que le type du pneumocoque exerce une influence sur la léthalité dans les pneumonies de l'enfance. Or, même dans ces cas, la virulence de la race ne joue aucun rôle; les pneumonies mortelles ont été occasionnées par des pneumocoques très virulents (types V et IV) aussi bien que par des germes à virulence faible (type XIV). Plus encore, le diagramme XI parle en faveur de cette affirmation : on n'y trouve aucune

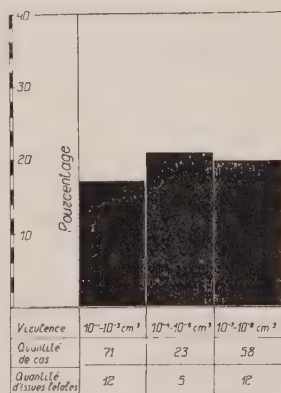


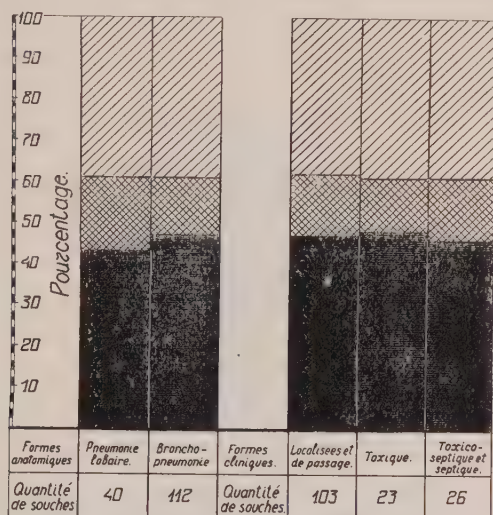
DIAGRAMME 10. — Virulence des pneumocoques du groupe X et évolution de la maladie.

corrélation entre la virulence de la race d'un pneumocoque et les formes anatomiques et cliniques de l'affection ; dans les pneumonies franches, dans les formes localisées, aussi bien que dans les bronchopneumonies et dans les formes septiques et toxico-septiques, on isole avec une fréquence égale des pneumocoques de virulence différente, et pourtant, la léthalité comme nous l'avons vu, présente de grandes variations suivant les formes anatomiques ou cliniques de la maladie. Enfin, pas de variations notables de la virulence suivant les saisons (voir diagramme XII), tandis que la léthalité en est fortement influencée.

Ainsi, l'examen approfondi de nos données montre d'une

façon incontestable que la virulence du pneumocoque, du moins celle déterminée sur la souris, indépendamment de la race à laquelle le germe appartient, ne joue pas de rôle considérable dans le développement des pneumonies infantiles et n'influence ni la gravité de l'infection, ni son issue. D'autre part, le type du pneumocoque est responsable de la forme

formes anatomiques. formes cliniques



■ $D\ell m = 10^{-1} - 10^{-3} \text{ cm}^3$ / culture de 18 h ⁶⁸/

▨ $D\ell m = 10^{-4} - 10^{-6} \text{ cm}^3$ " " " " " " " "

▩ $D\ell m = 10^{-7} - 10^{-9} \text{ cm}^3$ " " " " " " " "

DIAGRAMME 11. — Virulence des pneumocoques du groupe X.

anatomique, de l'évolution clinique et de la terminaison de la maladie. Comment expliquer cette discordance ?

D'abord, les facteurs déterminant le pouvoir pathogène du type peuvent ne pas être liés à la virulence mesurée sur la souris, ou bien ils peuvent ne pas agir dans la même direction ; ensuite, dans la pathogénie et l'évolution clinique, un rôle considérable est sans aucun doute dévolu aux facteurs dépendant du macro-organisme. Sans nous arrêter à la première supposition (qui fera l'objet d'une prochaine communication), nous essayerons d'éclaircir le rôle des facteurs dé-

pendant de l'organisme infecté. La résistance naturelle de l'organisme, aussi bien que l'état de l'immunité spécifique, entrent en jeu pour lutter contre l'infection. Or, l'immunité anti-pneumococcique naturelle est insignifiante même chez l'adulte ; il en est de même de l'immunité acquise post-infectieuse ; elle est peu accentuée et instable. Cette absence d'immunité bien prononcée et suffisamment stable, son caractère spécifique absolu par rapport au type aussi bien que la diversité sérologique du germe, expliquent, dans une certaine

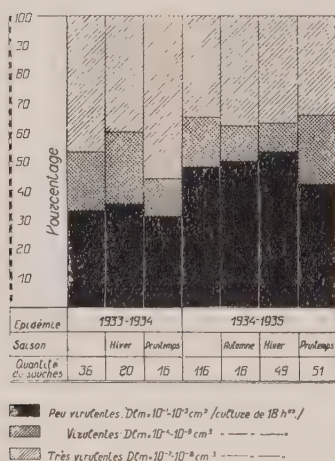


DIAGRAMME 12. — Virulence des pneumocoques du groupe X suivant la saison.

mesure, pourquoi la pneumonie peut plusieurs fois frapper le même sujet. L'immunité anti-pneumococcique est encore plus faible chez l'enfant du premier âge : d'une part, parce que la mère ne lui fournit pas, à la naissance, d'immunité passive ; d'autre part, il est incapable de produire lui-même des anticorps. Enfin, il ne faut pas oublier qu'un grand nombre de races sérologiques entrant dans le groupe X rend douteux le développement de l'immunité contre toutes ces races. Dans ces conditions, le facteur essentiel qui influence l'évolution et la terminaison des pneumonies de l'enfance est constitué par la résistance naturelle et les moyens de défense non spécifiques de l'organisme.

Il est intéressant d'analyser, à ce point de vue, les rapports entre la virulence du pneumocoque et l'âge des malades, la résistance de l'organisme dépendant avant tout de l'âge des enfants. Le diagramme XIII montre que la quantité des souches virulentes et très virulentes isolées chez les enfants de trois à douze ans est plus considérable que celle des souches isolées chez les enfants plus jeunes (jusqu'à moins de trois ans).

Une corrélation définie existe également entre la virulence des races isolées, le mode d'allaitement et la nutrition de l'en-

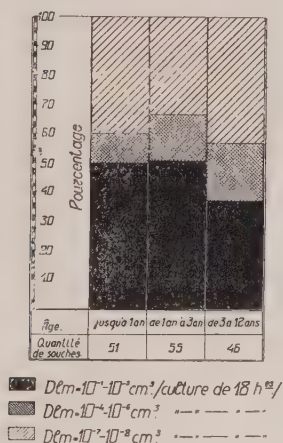


DIAGRAMME 13. — Virulence des pneumocoques du groupe X et âge des malades.

fant malade. Chez les enfants bien nourris et allaités au sein, nous avons le plus souvent isolé des races virulentes et très virulentes ; chez les enfants allaités artificiellement et mal nourris, les souches virulentes et à virulence faible ont été isolées avec une fréquence égale.

Conclusions.

1° L'examen bactériologique des crachats de 350 enfants atteints de pneumonie a permis d'isoler le pneumocoque dans

84 p. 100 des pneumonies franches et dans 74 p. 100 des bronchopneumonies ;

2° En déterminant, à l'aide de 31 sérums spécifiques, les types de 260 souches de pneumocoques, isolées dans les pneumonies de l'enfance, nous avons pu faire les constatations suivantes :

a) L'emploi de 28 sérums, préparés avec autant de types du groupe X, a permis de déterminer la race de toutes les souches isolées, rendant le pourcentage des pneumocoques non diagnostiqués presque égal à 0.

b) La différenciation sérologique des types de pneumocoques peut être réalisée par le procédé de la micro-agglutination de la culture soit avec des sérums monovalents, soit avec un mélange de ces sérums.

c) Les pneumocoques de différents types se rencontrent avec une fréquence variable : on isole le plus souvent les pneumocoques des types VI et I (chacun dans plus de 40 p. 100 des cas) ; suivent, par ordre de fréquence, les races III, II, XX, XIX (9 p. 100 à 5 p. 100). Les 6 types mentionnés constituent 51,5 p. 100 de toutes les souches isolées ; le groupe suivant, comprenant 8 types (XVIII, VIII, XIV, XXII, V, X, XVII et XXV), se rencontre dans 5 p. 100 à 3 p. 100 des cas, ce qui constitue 29,6 p. 100 du nombre total des souches isolées ; plus rares sont les races IV, VII, XV, XXVIII, IX, XIII, XI, XII et XXI (3 p. 100 à 1 p. 100), ce qui fait 15,5 p. 100 des souches isolées ; les types XXIV, XXIX, XXX, XXVII et XVI, qui constituent 3,4 p. 100 des souches, sont d'une grande rareté (moins de 1 p. 100) ; enfin, nous n'avons pas rencontré les types XXIII, XXXI et XXXII.

3° Le rôle étiologique des pneumocoques du groupe X dans les pneumonies de l'enfance est confirmé, d'une part, par l'examen bactériologique du sang, du pus et des pièces d'autopsie, aussi bien que par les analyses bactériologiques répétées des crachats au cours de la maladie, d'autre part, par les réactions immunologiques du sang des convalescents.

4° L'étude des variations annuelles saisonnières de la morbidité pneumonique chez les enfants, ainsi que la détermination du type suivant l'année et la saison, a donné les résultats suivants :

a) La courbe de la morbidité monte régulièrement de l'automne au printemps ;

b) La fréquence avec laquelle on isole certains types de pneumocoques varie suivant la période épidémique (variations annuelles) et suivant les saisons (variations mensuelles).

5° Les recherches sur les rapports entre le type du germe, l'âge des malades et la forme anatomique de l'affection ont montré que :

a) Les enfants jeunes (moins de trois ans) sont atteints presque exclusivement de bronchopneumonie (100 p. 100 : des enfants de moins de un an ; de un an à trois ans : 86 p. 100). Par contre, chez les enfants plus âgés, la pneumonie franche prédomine (78 p. 100) ;

b) Les pneumonies franches sont occasionnées pour la plupart (77 p. 100) par les pneumocoques des types I et II ; les bronchopneumonies sont surtout causées (78 p. 100) par le type III et les germes du groupe X.

c) Certaines races (XIX, XV, XXVIII, IX, XI, XXIX) se rencontrent presque exclusivement dans les bronchopneumonies ; les autres types ont été trouvés avec une fréquence plus ou moins grande aussi dans les pneumonies franches.

6° Dans l'étude des rapports entre le type du pneumocoque et l'évolution clinique, nous avons constaté que :

a) les pneumonies déterminées par différents types de pneumocoques se distinguent entre elles par leur évolution clinique, à savoir : les pneumonies déterminées par les races VIII, X, XXIX et XXX sont toujours localisées ; les formes toxiques sont le plus souvent occasionnées par les pneumocoques des types XVIII, XIX, III, VI, XV, XIV et I ; les types IV, XIV, V, XIII, XVII et XIX provoquent la plus grande partie des pneumonies septiques ;

b) les complications se rencontrent le plus souvent dans les pneumonies à types XI, XXVIII, IV, XIV et X. Dans les pneumonies causées par les races VIII, XV, XXIV et XXIX, les complications n'ont pas été notées. Nous n'avons pu établir aucun rapport entre le type du germe et le caractère des complications ;

c) la durée des pneumonies franches diffère notablement de celle des bronchopneumonies. Il n'y a pas d'interdépen-

dance entre le type du pneumocoque et la durée d'une pneumonie franche, qu'il occasionne. Dans les bronchopneumonies, la durée de la maladie varie suivant le type du germe causal.

7° L'étude de la léthalité dans les pneumonies infantiles a permis de constater les faits suivants :

a) La dynamique de la léthalité est influencée par l'organisme aussi bien que par le microbe ;

b) La léthalité varie considérablement suivant la forme anatomique, les bronchopneumonies présentant une léthalité considérable de 27 p. 100, tandis que dans les pneumonies franches elle n'est que de 1 p. 100 ;

c) La léthalité présente aussi de grandes variations suivant la forme clinique de la pneumonie : les pneumonies septiques donnant 83 p. 100 d'issues léthales, les pneumonies localisées ayant en général une évolution bénigne ;

d) La léthalité dépend également de l'âge des enfants malades : avant l'âge de trois ans, elle frappe 26 p. 100 des malades ; elle tombe à 5 p. 100 après trois ans ;

e) La léthalité dans les bronchopneumonies varie suivant le type du germe causal : les bronchopneumonies occasionnées par les types VII, X, XV, XII et XXIX présentent le plus souvent une évolution bénigne, les pneumonies à types IV, I, II, V, XIV, XVII et XI, au contraire, 40 à 50 p. 100 et plus d'issues fatales ;

f) La léthalité présente aussi des variations suivant les épidémies (variations annuelles) et suivant les saisons (variations mensuelles). La léthalité est plus faible au printemps, elle atteint le maximum en hiver. Les courbes de la léthalité et de la morbidité saisonnière ne se couvrent pas.

8° Les analyses bactériologiques répétées des crachats de 25 enfants malades ont montré que :

a) Le pneumocoque garde pendant toute la durée de la maladie son type sérologique et sa virulence primitive ;

b) Les pneumocoques peu virulents peuvent occasionner des pneumonies graves, de longue durée et à terminaison fatale ;

c) La convalescence paraît ne pas modifier la virulence du germe.

9° Les recherches sérologiques effectuées chez 18 convalescents de pneumonie ont donné les résultats suivants :

a) Des anticorps (préventifs et agglutinants) du type spécifique, isolés des crachats ont été constatés dans le sang de 61 p. 100 des convalescents ;

b) Les enfants en bas âge (jusqu'à trois ans) ne sont pas aptes à produire des anticorps spécifiques envers le pneumocoque ;

c) L'aptitude des enfants de trois ans à douze ans à produire des anticorps antipneumococciques est au-dessous de celle des adultes.

10° En étudiant le rôle du micro- et du macro-organisme dans la pathogénie, l'évolution clinique et la terminaison des pneumonies de l'enfance, nous avons constaté que :

a) La virulence du pneumocoque, déterminée sur souris, ne joue pas de rôle prépondérant dans le développement, la forme clinique et la terminaison de la pneumonie chez les enfants ;

b) Ce sont surtout les facteurs dépendant de l'organisme qui jouent le rôle prédominant dans la pathogénie, l'évolution et la terminaison de l'affection. Ces facteurs sont avant tout représentés par les moyens de défense non spécifiques de l'organisme atteint.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VIKTOROFF (L. K.), SEMZOWA (O. M.) et ETINGER (J. G.), *Zbl. f. Bakt.*, I. Orig., **129**, 1933, p. 324.
- [2] VIKTOROFF (L. K.), DOMBROVSKAIA (J. F.) et JEROFEEFF (L. A.), *Zbl. f. Bakt.*, I. Orig., **132**, 1934, p. 418.
- [3] GUNDEL (M.), *Z. f. Hyg.*, **115**, 1933, p. 495.
- [4] SUTLIFF (W. D.) et FINLAND (M.), *J. A. M. Assoc.*, **96**, 1931, p. 1485.
- [5] AVERY (O. T.), *J. exp. Med.*, **22**, 1915, p. 804.
- [6] STILLMAN (E. G.), *J. exp. Med.*, **29**, 1919, p. 251.
- [7] LISTER (F. S.), *Publication of South African Institute for Medical Research*, n° 8, 1916 ; n° 10, 1917.
- [8] OLMSTEAD (M.), *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **14**, 1916, p. 29.
- [9] CLOUGH (M. C.), *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **28**, 1917, p. 306.
- [10] GRIFFITH (F.), *Reports on publ. health and medic. subjects. Ministry of Health*, London, n° 13, 1922, p. 20.
- [11] ROBINSON (G. H.), *J. Infect. Dis.*, **41**, 1927, p. 417.
- [12] SUGG (J. Y.), GASPARI (E. L.), FLEMING (W. L.) et NEILL (J. M.), *J. exp. Med.*, **47**, 1928, p. 917.

- [13] HARRIS (A. L.), SUGG (J. Y.) et NEILL (J. M.), *J. exp. Med.*, **47**, 1928, p. 933.
- [14] COOPER (G.), ROSENSTEIN (C.), WALTER (A.) et PEIZER (L.), *J. exp. Med.*, **55**, 1932, p. 531.
- [15] COOPER (G.), EDWARDS (M.) et ROSENSTEIN (C.), *J. exp. Med.*, **49**, 1929, p. 461.
- [16] PLUMMER (N.), RAJA (A.) et SCHULTZ (S.), *Am. J. Dis. Childr.*, **40**, 1930, p. 557.
- [17] RAJA (A.), PLUMMER (N.) et SCHULTZ (S.), *Am. J. Dis. Childr.*, **42**, 1931, p. 57.
- [18] SCHRÖDER (M. C.) et COOPER (G.), *J. Inf. Dis.*, **46**, 1933, p. 384.
- [19] WEBSTER (L. T.) et HUGHES (T. P.), *J. exp. Med.*, **53**, 1931, p. 595.
- [20] SABIN (A. B.), *J. Infect. Dis.*, **46**, 1930, p. 469.
- [21] VIKTOROFF (L. K.), SEMZOWA (O. M.) et MASEL (J. J.), *Zbl. f. Bakter.*, I. Orig., **130**, 1933, p. 35.
- [22] WOLLSTEIN (M.), *New-York State J. Med.*, **23**, 1933, p. 148.
- [23] LYON (A. B.), *Am. J. Dis. Childr.*, **23**, 1922, p. 72.
- [24] ROBERTSON et CORNWELL, *J. exp. Med.*, **52**, 1930, p. 267.
- [25] WHITTLE (G. H.), *J. Hyg.*, **27**, 1928, 200, p. 412.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU *PLASMODIUM KNOWLESI* CHEZ LE SINGE ET CHEZ L'HOMME

par A.-M.-D. JOLLY, LAVERGNE et TANGUY.

(Travail du Laboratoire de M. le Prof. MARCHOUX.)

I. — Place du *Plasmodium knowlesi* dans l'étude expérimentale du paludisme.

Jusqu'en 1932, l'étude expérimentale du paludisme s'est trouvée entravée dans son extension, car son champ était étroitement limité aux seules infections naturelles. Toutes les tentatives faites pour infecter expérimentalement les diverses espèces animales par des hématozoaires étaient restées, en dehors des singes, constamment négatives, qu'on se soit adressé ou non à des espèces (mammifères ou oiseaux) dont on connaissait des infections naturelles à *Plasmodium*.

En ce qui concerne les singes inférieurs, Mesnil et Roubaud, en 1920, après avoir fait l'historique des nombreuses tentatives faites pour leur inoculer les divers *Plasmodium* connus, concluaient : « ... De tout ce qui précède, il ressort nettement qu'un *Plasmodium* déterminé ne s'attaque qu'à une seule espèce ou à un petit nombre d'espèces voisines; l'extension la plus grande a été trouvée pour le *Plasmodium inui*, qui est infectant et en même temps pathogène pour des représentants divers de la grande famille des singes catarrhiniens, des *Cercopithecidae* comprenant : macaques, cercopithèques et cynocéphales. Il était vraisemblable, *a priori*, et l'expérience l'a confirmé, que les *Plasmodium* humains ne sont pas inoculables aux singes catarrhiniens inférieurs ».

Il restait à approfondir la question de la sensibilité des singes anthropoïdes déjà annoncée par Koch. Essayant de transmettre des hématozoaires humains au chimpanzé, Mesnil et Roubaud montrèrent que « s'il était difficile de conclure à la sensibilité du chimpanzé à l'égard du paludisme humain, leur expérimentation permettait d'affirmer cependant que ce type

de singe présentait un certain degré de sensibilité. Pour la première fois, on a pu constater la multiplication et le maintien, pendant plusieurs générations, dans un organisme animal, du *Plasmodium* d'un paludisme humain ». Ce fait montrait que le chimpanzé se trouvait à la limite de la résistance animale à une infection considérée jusque-là comme strictement humaine.

Aucun fait nouveau devant modifier ces conclusions ne fut apporté jusqu'en 1932.

Le travail de Knowles et Das Gupta, en 1932, fit connaître un nouvel hématozoaire, découvert chez *Silenus irus* par Napier et Campbell, et très différent *du point de vue biologique*, de tous ceux connus jusqu'alors, en ce que ce parasite s'éloigne de la spécificité étroite des autres hématozoaires, étant infectant et pathogène pour un grand nombre d'espèces de singes inférieurs, aussi bien que pour l'homme. *Du point de vue morphologique*, ce *Plasmodium* était également très particulier en ce que, d'après la description des auteurs anglais, il présentait une polymorphie étonnante, contrastant avec la fixité habituelle des caractères distinctifs des autres hématozoaires, et que s'il ressemblait, par certains de ses caractères, à chacun des *Plasmodium* humains, il n'était identifiable cependant à aucun d'entre eux.

Grâce à ce nouveau matériel d'étude, offrant des possibilités de transmission inconnues jusqu'alors, de nombreux chercheurs utilisèrent ce parasite pour développer l'étude expérimentale du paludisme, concurremment sur l'homme et sur les singes.

Pour bien saisir le sens et la valeur de ces travaux, il est nécessaire d'abord de bien caractériser ce nouvel hématozoaire et, pour cela, de partir d'une base solide en reprenant les termes de la description qu'en firent les premiers auteurs.

II. — Caractéristiques du *Plasmodium knowlesi* d'après Knowles et Das Gupta.

L'étude princeps sur le *Plasmodium knowlesi* a été faite dans le très important mémoire de Knowles et Das Gupta, de juin 1932 : « Study of Monkey malaria ».

Dans leur travail, Knowles et Das Gupta attirent spécialement l'attention sur les quatre points suivants:

A. Les très grandes variations de sensibilité ou de résistance au même virus des singes de différents genres ou espèces.

B. L'apparition spontanée de Fièvre bilieuse hémoglobinurique comme événement terminal chez les singes de l'espèce *Silenus rhesus* mourant de cette attaque de paludisme du singe, et cela sans administration de quinine.

C. Le succès de la transmission expérimentale de ce paludisme du singe à l'homme, et les caractères cliniques de la maladie ainsi étudiée chez l'homme.

D. Les variations extrêmement embarrassantes de la morphologie de cette seule et même espèce de *Plasmodium* simien, lorsqu'il est inoculé à des singes de différents genres ou espèces ou à l'homme.

Les auteurs précisent ces caractères par l'étude analytique du *Plasmodium* sur des singes de différentes espèces et sur des hommes qu'ils ont soumis à l'expérimentation, et ils distinguent 3 types morphologiques et biologiques principaux chez ce parasite :

Le type désigné sous le nom de Cercopithèque n'est pas juste parce que le singe, sur lequel Napier et Campbell ont pour la première fois rencontré le parasite et que, par erreur, ils avaient identifié au *Cercopithecus pygerithrus*, a été plus tard par Knowles reconnu appartenir à l'espèce *Silenus irus*.

1° TYPE CERCOPITHÈQUE. — Le parasite apparaît comme une infection naturelle du singe *Silenus irus*. Chez cette espèce animale, les infections sont larvées et leur guérison survient spontanément en quelques jours ou semaines, ou bien une très légère infection persiste sur des périodes prolongées pouvant atteindre au moins sept mois. Ces animaux ne présentent aucun signe de maladie.

Morphologiquement, les parasites, jamais abondants, ressemblent au *Pl. vivax* de l'homme : les globules rouges sont augmentés de volume, pâles et montrent des granulations de Schüffner très nettes ; les trophozoïtes sont très amiboïdes ; les gamétocytes sont relativement abondants ; mais, signe particulier, les rosaces à maturité ont de 9 à 10 mérozoïtes groupés

en grappe autour du pigment rassemblé en un gros amas disposé excentriquement.

Les auteurs anglais donnent à cet ensemble de caractères le nom de « Cercopithecus type ». Ils lui opposent cliniquement et morphologiquement le « Rhesus type » et le « Human-Monkey type ».

2° TYPE RHESUS. — Ils notent, en effet, chez le *S. rhesus*, une différence complète dans l'évolution clinique de la maladie et dans la morphologie du parasite. Cette race simienne est excessivement sensible au parasite, et l'infection, invariablement fatale, se développe avec une fièvre élevée, une anémie profonde progressive et une très intense multiplication des hématozoaires atteignant jusqu'à 3.100.000 par millimètre cube. La mort survient après une chute soudaine de la température au-dessous de la normale. A l'autopsie, les viscères sont bourrés de parasites et de pigment.

Morphologiquement, les jeunes anneaux et les trophozoïtes ressemblent au *Pl. falciparum* humain, alors que les gamétocytes arrondis et jamais en croissant se rapprochent de ceux du *Pl. malariae*. Les schizontes mûrs ont 10 mérozoïtes groupés en grappe autour d'un amas de pigment placé excentriquement.

L'évolution terminale chez le Rhesus est parfois accompagnée de fièvre bilieuse hémoglobininurique, ce qui peut en rendre possible l'étude expérimentale étiologique et pathogénique chez l'animal.

Chez les singes, d'autres espèces étudiées (4 *Macacus radiatus*, 2 *Semnopithecus entellus*, 1 *Hylobates hoolock*, 1 *Macacus cynomolgus*), les auteurs notent une sensibilité très variable à l'infection. Les uns, comme le *Semnopithecus entellus*, se rapprochent du *S. rhesus* par leur sensibilité, et l'évolution, habituellement mortelle, de l'infection ; les autres y paraissent, au contraire, résistants et ne font que des infections larvées comparables à celles des *S. irus*. Mais chez les uns comme chez les autres, la morphologie des parasites est identique à celle du *S. rhesus*, et occupe une position intermédiaire entre le *Pl. falciparum* et le *Pl. malariae*.

3° TYPE HUMAIN DU *PLASMODIUM* SIMIEN. — L'expérimentation des auteurs anglais sur l'homme fut faite sur 3 paralytiques généraux :

Le premier fit une fièvre de moyenne intensité à tendance rémittente quotidienne à maximum thermique de 38°2 qui, après une très légère rechute, guérit spontanément.

Le deuxième eut une attaque sévère de malaria, avec température atteignant 40° et, après une chute soudaine de la température au-dessous de la normale coïncidant avec l'extermination des parasites, guérit spontanément.

Le troisième eut seulement une légère fièvre rémittente quotidienne pendant quatre jours, suivie de guérison complète.

Chez tous les 3, la guérison survint sans administration de quinine ou autre médicament antipalustre. Les parasites ressemblaient plutôt au *Pl. malariae* : les globules rouges n'étaient pas hypertrophiés, mais légèrement contractés ; mais certains montraient des granulations de type Schüffner ou bien plutôt des taches de Ziemann en coloration par la méthode de Shute (James, 1929). Les rosaces mûres étaient à 10 mérozoïtes disposés en grappe sur un amas de pigment excentrique.

4° FORMES DE PASSAGE ENTRE LES DIFFÉRENTS TYPES DU PARASITE. — Malgré cette division des parasites en trois types bien définis, suivant les espèces d'animaux envisagées, les auteurs sont amenés à faire entre eux les rapprochements suivants :

a) Chez les *S. irus* inoculés après passage du parasite sur *S. rhesus*, les parasites restèrent du type morphologique *Rhesus* ; mais le caractère amiboïde des trophozoïtes et l'occasionnelle constatation d'une légère hypertrophie des globules rouges ou de granulations montre leur tendance à revenir vers le type *S. irus*.

b) Malgré la grande variabilité des premières phases de développement du parasite chez les diverses espèces d'animaux ou chez l'homme, la texture des rosaces mûres est absolument constante morphologiquement, avec ses 10 mérozoïtes. Les gamètes ressemblent à ceux du *Pl. malariae* dans toutes les espèces, excepté chez le *S. irus* où ils ressemblent aux gamètes du *Pl. vivax*.

5° CYCLE ÉVOLUTIF DU PARASITE. — Le cycle évolutif du parasite, qui était impossible à déterminer chez les *Silenus* dont l'infection était si fruste, ne put être fixé non plus par cultures suivant la méthode de Bass, du fait de la pullulation de trophozoïtes et de schizontes à tous les stades de développement au même instant. Il ne put être fixé non plus par les courbes thermiques de type rémittent quotidien ou intermittent qui ne signifient pas grand'chose, James ayant montré que l'accès de première invasion de la tierce bénigne se manifeste par une fièvre à périodicité quotidienne chez l'homme.

Mais le *S. rhesus* 15 montra les figures suivantes :

Le 30 novembre 1931, à 17 heures, le sang contient 280.000 parasites par millimètre cube, tous jeunes anneaux.

Le 1^{er} décembre 1931, à 17 heures, infection suraiguë avec 3.400.000 parasites par millimètre cube, comprenant seulement de jeunes anneaux.

Knowles et Das Gupta en conclurent que ceci pouvait être l'indication d'un cycle de vingt-quatre heures, mais demandèrent des investigations plus poussées.

Sinton et Mulligan ont sur *Silenus irus* dans un cas tout à fait semblable à celui de Knowles et Das Gupta, séparé deux espèces d'hématozoaires : l'une *P. inui* variété *cynomolgi*, l'autre à laquelle ils ont attribué le nom de *P. knowlesi*.

La première se distingue par ses qualités amiboïdes marquées ; la présence d'une vacuole, grande dans les formes jeunes, qui disparaît plus tard ; le pigment brun doré apparaissant tardivement et en grains très fins ; hématies distendues, piquetées de grains de Schüffner. Evolution en quarante-huit heures.

La seconde douée de faibles propriétés amiboïdes ; vacuole petite qui disparaît rapidement ; pigment brun tirant sur le noir ; pas de distension appréciable des hématies qui sont pâles dans les formes avancées, mouchetées seulement par colorations spéciales. Cycle évolutif : vingt-quatre heures.

III. — Recherches expérimentales personnelles sur le *Plasmodium knowlesi*.

Le professeur Ciuca, de Bucarest, ayant eu l'extrême obligeance, dont nous le remercions ici, d'envoyer au professeur Marchoux, à l'Institut Pasteur de Paris, une souche de *Pl. knowlesi*, originaire de Calcutta, celui-ci a bien voulu nous charger d'étudier ce parasite. Et ce sont les résultats de cette expérimentation que nous rapportons ici.

Le sang parasité, transporté par avion de Bucarest à Paris, nous parvint dans d'excellentes conditions, et, à l'arrivée, on constatait de très nombreuses hématies parasitées.

Immédiatement, un *S. rhesus* fut inoculé avec 10 cent. cubes de sang par voie intra-veineuse. Cette première inoculation permit de faire une série de passages sur des singes de différentes espèces, et de tenter l'impaludation humaine sur des paralytiques généraux de l'asile Sainte-Anne, dans le service du docteur Guiraud, que nous remercions vivement de l'excellent accueil qu'il voulut bien nous réserver en mettant à notre disposition toutes les ressources de son service hospitalier.

Cette expérimentation nous a permis de préciser l'étude morphologique et les affinités biologiques du parasite sur les singes et sur l'homme.

IV. — Expérimentation du *Plasmodium knowlesi* sur les singes inférieurs et les hommes.

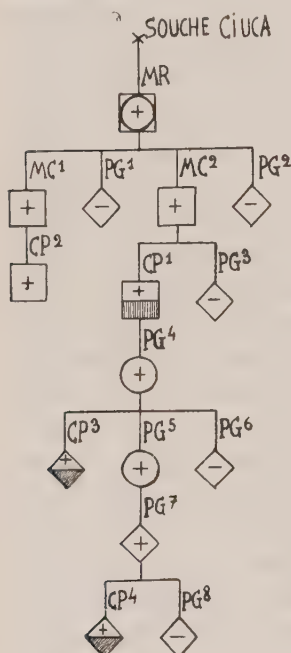
Les inoculations suivantes furent pratiquées à partir de la souche envoyée de Bucarest à Paris en avion par le professeur Ciuca.

L'étude expérimentale du *Pl. knowlesi* que nous avons faite sur ces hommes et ces singes de diverses espèces, nous a amenés à formuler quelques conclusions assez différentes de celles énoncées par Knowles et Das Gupta dans leur mémoire de 1932, et sur lesquelles nous insisterons particulièrement.

**Tableau récapitulatif des inoculations pratiquées
avec le *Plasmodium knowlesi*.**

1° Désignation des sujets mis en expérience :

PG, paralytiques généraux; MR, *Macacus rhesus*; MC, *Macacus cynomolgus*; CP, *Cynocephalus papio*.



**2° Désignation
des signes abrégatifs :**

- ◊ - Impaludation négative.
- ◊ + Impaludation positive, suivie de guérison spontanée.
- ◊ + Infection palustre, suivie de guérison spontanée de l'animal, malgré splénectomie.
- ⊕ Impaludation positive, guérison par traitement quinqué.
- ⊕ Infection palustre mortelle, non traitée.
- ⊕ Infection palustre ayant entraîné une fièvre bilieuse hémoglobinurique terminale mortelle.
- ⊕ Infection palustre mortelle, malgré le traitement quinqué.

**A. — SENSIBILITÉ DE RACE ET SENSIBILITÉ INDIVIDUELLE
DES SINGES INFÉRIEURS ET DE L'HOMME
AU « *PLASMODIUM KNOWLESI* ».**

1° Sensibilité des singes inférieurs au « *Pl. knowlesi* ». —

La sensibilité des singes de différentes espèces de la famille *Cercopithecidae* au *Pl. knowlesi* ne paraît pas régie par une règle aussi stricte que celle énoncée par Knowles et Das Gupta qui distinguent deux types très différents de sensibilité au virus suivant la race à laquelle appartiennent les singes : le type « Cercopithèque » à infection larvée et guérison spontanée, et le type « Rhesus » à infection grave toujours mor-

telle (types réactionnels auxquels d'ailleurs des modifications morphologiques du parasite viendraient ajouter une nouvelle base de différenciation).

Les singes de différentes races, que nous avons inoculés directement, de singe à singe, avec ce parasite, ont tous montré une grande sensibilité à cette infection palustre. Le degré de sensibilité s'est montré équivalent d'une espèce à l'autre. Les variations observées gardèrent un caractère strictement individuel, de telle sorte qu'il n'apparaît pas possible, cliniquement, de décrire des types réactionnels différents suivant les races, chez les divers représentants de la famille des *Cercopithecidae*.

En particulier, l'apparition d'un syndrome bilieux-hémoglobinurique n'est pas l'apanage exclusif de l'espèce *S. rhesus*, mais peut s'observer dans d'autres espèces.

L'infection par le *Pl. knowlesi* provoqua chez tous les singes expérimentés un paludisme mortel, après une évolution plus ou moins brutale. La mort se produisit toujours après une chute en hypothermie de la température. La durée de l'évolution, variable suivant les animaux, parut directement influencée par la résistance que leur organisme opposait à la multiplication des parasites dans le sang.

Les accès fébriles observés furent variables dans leur intensité et dans leur périodicité :

1° Ils ne parurent pas directement influencés par les phases propres du cycle de développement du parasite. Il n'y eut qu'occasionnellement concordance entre la périodicité du cycle fébrile et du cycle parasitaire.

2° Les accès fébriles, constatés à des intervalles très variables dans chaque cas, se manifestaient toujours aux périodes de pullulation les plus intenses des parasites dans le sang. L'accès fébrile était constamment suivi d'une diminution très importante du nombre des parasites.

3° L'activité multiplicatrice des hématozoaires fut très différente suivant l'état de résistance individuelle de chaque animal au parasite. On ne constata d'accès fébrile que dans les cas où l'organisme ne parvenait pas à entraver la pullulation parasitaire. Le rythme de périodicité des accès parut

d'autant plus rapide que la multiplication des parasites était plus intense.

4° L'épuisement des forces réactionnelles de l'animal se manifesta constamment par la chute en hypothermie de la température, précédant de peu la mort, en même temps que se développaient la cachexie et l'anémie. Cette chute thermique survenait soit brusquement à la suite d'accès fébriles intenses, soit progressivement comme terme de l'évolution prolongée, torpide, d'une infection palustre où, à aucun moment, il n'y avait eu de pullulation intense des parasites, ni d'accès fébriles marqués.

5° Aussi, semble-t-il bien que l'accès fébrile fût la manifestation d'un effort brusque de l'organisme pour se débarrasser des parasites lorsque leur nombre devenait trop grand pour être toléré, leur multiplication n'ayant pu être entravée auparavant par d'autres modalités réactionnelles.

L'évolution du *Pl. knowlesi* chez l'homme nous a paru concorder exactement avec les constatations faites sur le singe, à la différence d'intensité près.

OBSERVATIONS.

1° *S. rhesus* : Inoculé le 23 janvier 1936 par voie intraveineuse, avec sang infecté par *Pl. knowlesi*, arrivé de Bucarest par avion (souche Ciuca) [Graphique 1].

Evolution mortelle en trente-quatre jours. Incubation de trois jours. Le quatrième jour, apparition d'hématozoaires et accès fébrile. Un traitement quinique et stovarsolique immédiatement appliqué fit disparaître les hématozoaires, mais ils réapparurent dès le lendemain de la cessation du traitement. Accès fébrile intense au bout de quatre jours, suivi de 5 accès espacés chacun de quatre jours.

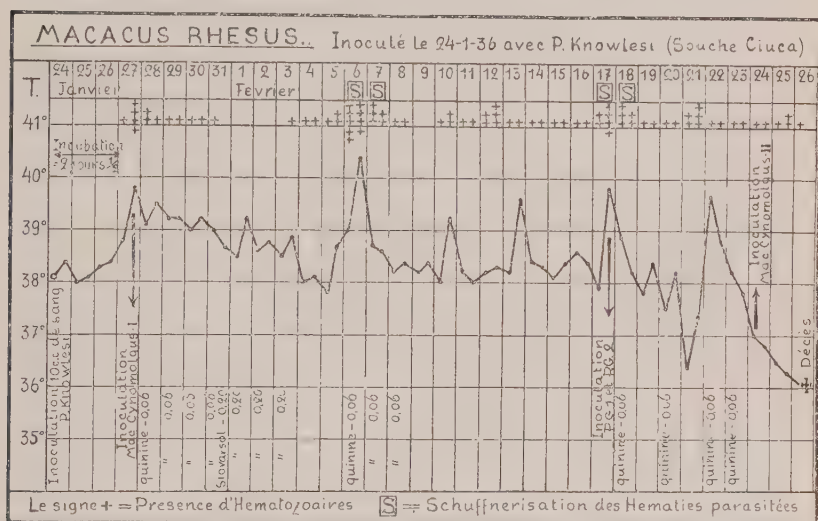
L'examen hématologique bi-quotidien montra l'influence directe exercée par les accès fébriles sur la multiplication des hématozoaires : le nombre des parasites, que l'on voyait augmenter progressivement chaque jour, tombait brusquement lorsqu'un accès fébrile se produisait, puis la multiplication des parasites reprenait jusqu'à un nouvel accès fébrile. Ceci se renouvela jusqu'au moment où l'animal ne put plus faire les frais de cette réaction brutale et mourut par anémie et cachexie aiguë après une chute soudaine en hypothermie de la température (26 février 1936).

2° *S. cynomolgus* I : Infecté le 27 janvier 1936, par voie intramusculaire, avec 5 cent. cubes de sang de *S. rhesus* (Graphique 2).

Evolution mortelle en soixante jours. Délai d'incubation parasitaire de quatre jours. Les hématozoaires, constamment trouvés chaque jour,

furent toujours peu nombreux, parfois très rares. L'animal ne présenta aucun accès fébrile, ni aucun symptôme morbide pendant quarante-cinq jours ; à partir de ce moment, son état général s'altéra progressivement, il maigrit, parut fatigué, perdit l'appétit. La température présenta alors, pendant quatre jours, de larges oscillations quotidiennes, sans qu'il y eût augmentation parallèle du nombre des parasites. Puis rapidement l'anémie avec cachexie se développa en même temps que la température se mit à descendre progressivement. Mort en hypothermie le soixantième jour après l'inoculation (25 mars 1936).

En résumé : état de résistance marquée au parasite ; absence de pul-



GRAPHIQUE 1.

lulation massive des hématozoaires ; absence, jusqu'à la phase ultime, de réaction fébrile, mais cependant persistance de l'infection parasitaire entraînant progressivement l'anémie et la cachexie, et mort en hypothermie lorsque la résistance organique fut complètement défaillante.

3° *Cynocéphale papio* II : Singe en bon état général, malgré la constatation, quelques mois auparavant, d'une ophtalmoréaction à la tuberculine fortement positive (Graphique 3).

Inoculé le 24 mars 1936 avec 5 cent. cubes intraveineux de sang du *S. Cynomolgus* I. Etat de choc avec dyspnée après l'inoculation. Léger accès de fièvre le troisième jour, sans hématozoaire dans le sang, suivi d'une ébauche de chute en lysis de la température.

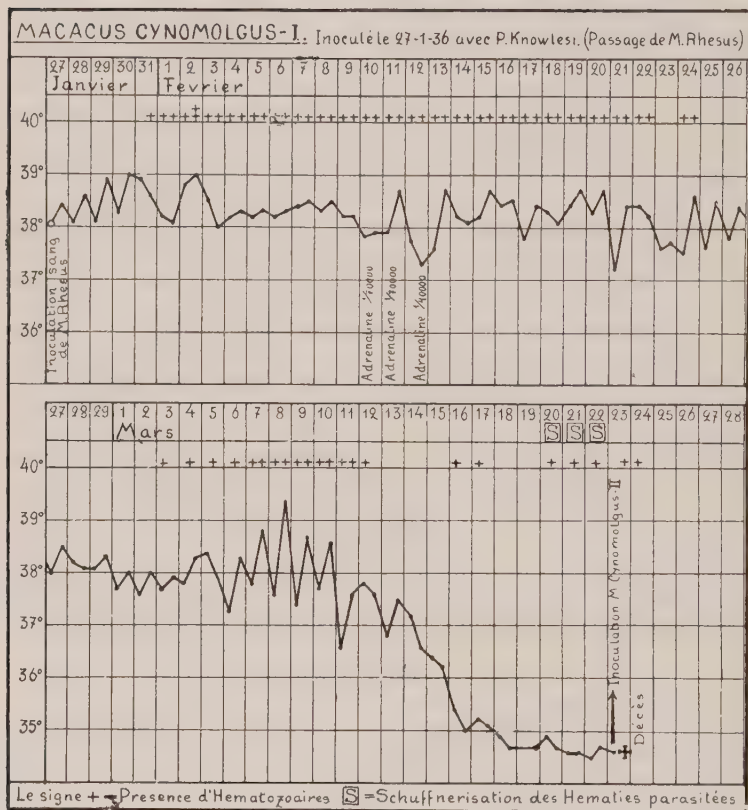
Le 1^{er} avril, accès fébrile peu élevé avec apparition d'assez nombreux hématozoaires dans le sang (schizontes annulaires et rosacés à 8 mérozoïtes), accès de dyspnée et toux. La durée d'incubation parasitaire est de sept jours.

Le lendemain, nouvel accès fébrile moins élevé, suivi de chute en

hypothermie de la température. Animal très dyspnéique, rares hématozoaires dans le sang.

Décès le 4 avril en hypothermie, le douzième jour après l'inoculation.

A l'autopsie : tuberculose ulcéro-caséeuse du poumon droit, et lésions tuberculeuses disséminées sur les divers organes. Le foie et la rate



GRAPHIQUE 2.

contiennent d'assez nombreux hématozoaires, tous au stade de schizonte annulaire fin.

En résumé : anergie au paludisme, secondaire à une infection tuberculeuse chronique torpide ; évolution foudroyante du paludisme sur ce terrain déficient, et mort en douze jours, bien qu'il n'y ait pas eu de pullulation massive d'hématozoaires, ni d'accès fébrile franc ; ce qui montre la défaillance de toute réaction organique à cette infection surajoutée.

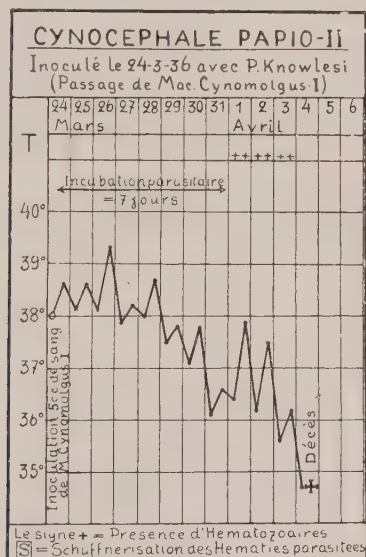
4° *S. cynomolgus* II : Inoculé le 24 février 1936 avec 3 cent. cubes de

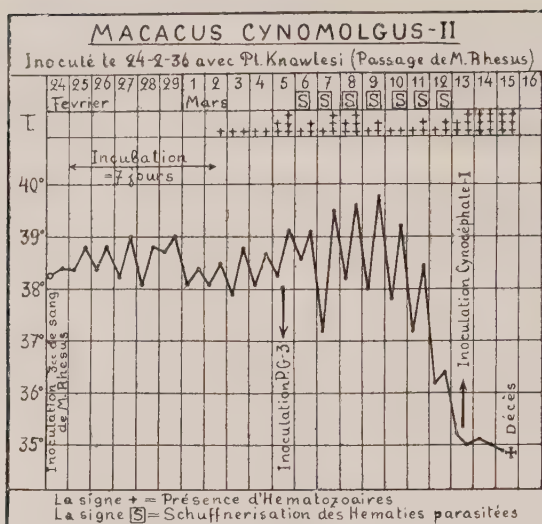
sang de *S. rhesus*, par voie intra-musculaire. Evolution mortelle en vingt jours (Graphique 4).

Le 2 mars : apparition des premiers hématozoaires (schizontes annulaires). Délai d'incubation : sept jours.

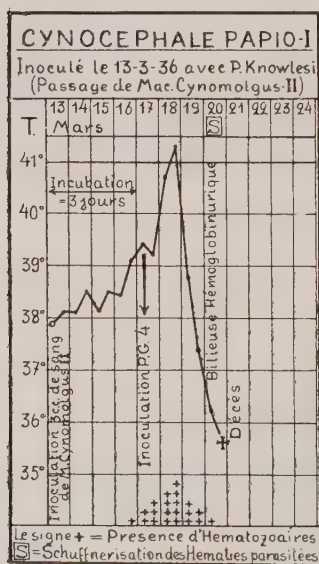
Les jours suivants : augmentation rapide des hématozoaires et élévation progressive de la température (sans accès fébrile) jusqu'au 6 mars.

A partir du 6 mars, accès fébriles quotidiens qui paraissent rythmés directement sur le cycle parasitaire : accès vespéral au moment de la plus grande pullulation des parasites qui sont tous alors au stade de jeunes schizontes annulaires fins; défervescence matinale au moment





GRAPHIQUE 4.



GRAPHIQUE 5.

Le 16 mars, apparition des premiers schizontes annulaires fins, température à 39°1. Délai d'incubation parasitaire : trois jours.

Les jours suivants, le nombre d'hématozoaires augmente très rapidement, en même temps que la température s'élève pour atteindre 41°2 le 18 mars. A ce moment, l'infestation parasitaire est massive, deux globules sur trois sont parasités.

Le 19 mars, chute brutale de la température et, dans l'après-midi, apparition d'un *syndrome de bilieuse-hémoglobinurique*. Les urines porto donnent très fortement toutes les réactions caractéristiques de l'hémoglobine. Mort en hypothermie le 20 mars au matin.

A l'autopsie, dans le sang du cœur et dans les divers organes, presque toutes les hématies sont lysées, laissant voir en liberté les hématozoaires à leurs différents stades d'évolution. La mort est survenue par la destruction massive des 9/10 des hématies à la suite de l'accès fébrile, entraînant le syndrome bilieux-hémoglobinurique.

Aucune cause surajoutée à l'infection palustre n'est à relever dans la production de cette bilieuse, en particulier pas de traitement quinique, ni de refroidissement.

Des observations ci-dessus rapportées, il ressort que les singes de différentes espèces de la famille des *Cercopithecidae* se sont tous montrés très sensibles à l'infection expérimentale par le *Pl. knowlesi*. L'évolution de la maladie fut toujours mortelle. Les variations dans l'intensité de la pullulation parasitaire et dans les réactions fébriles observées sont à reporter aux différences individuelles de résistance des animaux.

Nous réservons pour un chapitre suivant le résumé des observations des Cynocéphales III et IV, dont l'inoculation fut effectuée à partir de passages du parasite sur l'homme. L'évolution de l'affection chez ces animaux est tellement à opposer à celle observée chez ceux qui furent inoculés directement de singe à singe, qu'elle donne lieu à des considérations particulières qui seront développées dans le chapitre où nous traiterons de l'atténuation de la virulence du *Pl. knowlesi* après passage sur l'homme.

II. — RÉCEPTIVITÉ ET SENSIBILITÉ DE L'HOMME AU « *PL. KNOWLESI* ».

La sensibilité de l'homme au *Pl. knowlesi* paraît immédiatement très différente de celle que nous venons d'observer chez les singes inférieurs. Et tout d'abord, l'homme paraît s'infecter très difficilement avec ce parasite. Alors que toutes les

inoculations avaient été suivies d'infection (même en partant de sang pauvre en parasites) dans les passages de singe à singe, nous avons constaté d'abord, chez l'homme, trois inoculations non suivies d'infection avec les sangs riches en parasites du *S. rhesus* et du *Cynomolgus* II (P. G. 1, 2 et 3).

Par la suite, nous avons été plus heureux et avons obtenu une infection en partant du sang du Cynocéphale *papio* 1 dont l'infection parasitaire était massive (P. G. 4).

Les inoculations d'homme à homme faites à partir de ce cas furent souvent inefficaces, et, au total, sur 8 paralytiques généraux mis en expérience, 3 seulement firent une infection palustre.

Les infections présentées par ces hommes furent toujours passagères, de caractère bénin, et à pullulation parasitaire faible. Les accès fébriles présentés furent de types différents, mais jamais très élevés (sauf dans le cas du P. G. 7 où il y avait association du *P. vivax* au *P. knowlesi* au moment des grands accès fébriles). La tendance spontanée à la guérison fut la règle, et les prises de quinine données par sécurité vinrent très facilement à bout des parasites.

OBSERVATIONS.

Paralytiques générales 1 et 2 : Inoculées avec 5 cent. cubes de sang du *S. rhesus* par voie intra-veineuse le 17 février 1936, ne présentèrent, par la suite, aucun accès fébrile et aucun hématozoaire ne put être décelé dans leur sang à la suite de cette infestation.

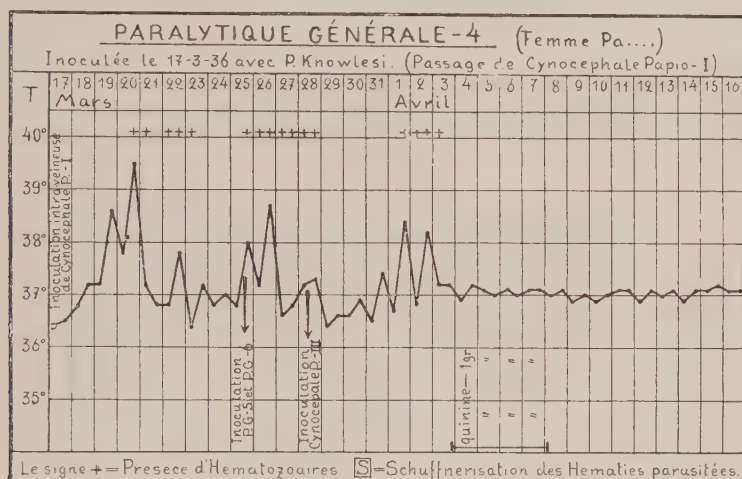
Paralytique générale 3 : Inoculée avec 5 cent. cubes de sang du *S. cynomolgus* II, par voie intra-veineuse le 5 mars 1936, ne présenta aucune réaction fébrile, et aucun hématozoaire ne put être décelé dans son sang à la suite de cette infestation.

Paralytique générale 4 : Inoculée le 17 mars 1936 avec 3 cent. cubes de sang du Cynocéphale *papio* 1 par voie intra-veineuse, fit les 19 et 20 mars deux accès fébriles ; présence d'hématozoaires le 21 (incubation : quatre jours). Persistance des hématozoaires les 21, 22 et 23, puis disparition ; nouveaux accès fébriles avec présence d'hématozoaires les 25, 26, 27, 28 mars (inoculation des P. G. 5 et 6 le 25 mars et du Cynocéphale III le 28).

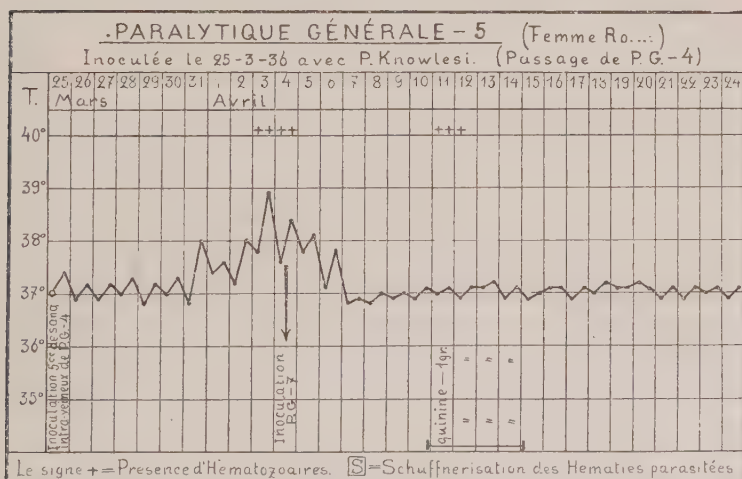
Troisième série d'accès fébriles et présence d'hématozoaires les 1^{er}, 2 et 3 avril.

Traitement quinique les 5, 6, 7 et 8 avril ; la température est complètement apyrétique à partir de ce moment et les examens de sang négatifs (Graphique 6).

Paralytique générale 5 : Inoculée le 25 mars 1936 avec 5 cent. cubes intra-veineux de sang de la P. G. 4. Le 31 mars, léger accès fébrile sans



GRAPHIQUE 6.



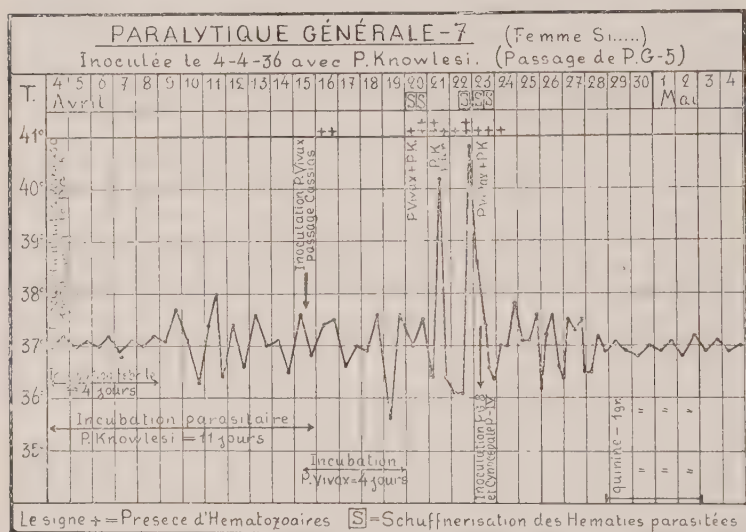
GRAPHIQUE 7.

hématozoaires (incubation fébrile : cinq jours). Fièvre de type rémittent à partir de ce moment ; les parasites apparaissent dans son sang le 3 avril (incubation parasitaire : huit jours). [Graphique 7.] Inoculation de la P. G. 7 le 4 avril.

Le 5 avril, disparition des hématozoaires et chute de la température en lysis jusqu'à la normale. Réapparition des hématozoaires les 11 et 12 avril. Un gramme de quinine pendant quatre jours les fait disparaître et stérilise définitivement le malade.

Paralytique générale 6 : Inoculée le même jour et dans les mêmes conditions que la P. G. 5. Ne présente, à la suite de cette inoculation, aucun accès fébrile; aucun hématozoaire ne put être décelé chez elle. Des injections d'adrénaline ne firent pas apparaître d'hématozoaire.

Paralytique générale 7 : Inoculée avec 5 cent. cubes de sang de la



GRAPHIQUE 8.

P. G. 5 par voie intra-veineuse le 4 avril, reste apyrétique jusqu'au 29 avril. A partir de cette date, la température devient régulière, mais on ne peut découvrir aucun hématozoaire. Le 15 avril, on fait une seconde inoculation avec une souche de *Pl. vivax*.

Le 16 avril, on constate la présence de rares hématozoaires se rapportant plutôt au *Pl. knowlesi*? (formes jeunes difficilement identifiables). Ces parasites disparaissent le lendemain (Graphique 8).

Le 20 avril, sans qu'il y ait d'élévation thermique, on constate la présence de nombreux hématozoaires paraissant relever d'une infestation double par le *Pl. knowlesi* et le *Pl. vivax*.

Le 21, accès fébrile à 40°1. Toutes les formes de parasites trouvées paraissent se rapporter uniquement au *Pl. knowlesi* (formes amiboïdes larges, sans hypertrophie globulaire, ni schüffnerisation, rares gamètes et rosaces).

Le 22, à minuit, nouvel accès fébrile à 40°8 ; les hématozoaires sont rares, le sang un peu laqué ; il est difficile de se prononcer avec sûreté

sur l'espèce du parasite causal. Inoculation de la P. G. 8 et du Cynocéphale IV le 23 au matin.

Le 24, rares hématozoaires appartenant nettement au *Pl. vivax*.

Disparition des hématozoaires ensuite ; la température est régularisée à partir du 30 avril où 1 gramme de quinine fut donné pendant quatre jours.

Paralytique générale 8 : Inoculée le 23 avril avec 3 cent. cubes de sang de la P. G. 7 par voie intra-veineuse, ne présenta, par la suite, ni accès fébrile, ni hématozoaire dans son sang.

Toutes ces observations concordent pour montrer la sensibilité de l'homme au *Plasmodium knowlesi*, hôte originel du singe.

Les essais de retransmission du parasite, de l'homme au singe, ajoutent à la notion de faible sensibilité de l'homme à l'égard de ce virus une autre notion importante : celle de l'atténuation de la vitalité et de la virulence du parasite par son passage sur l'homme.

III. — ATTÉNUATION DE LA VITALITÉ ET DE LA VIRULENCE DU « *PL. KNOWLESI* » PAR PASSAGE SUR L'HOMME.

Deux singes, les Cynocéphales *Papio* III et IV, furent inoculés avec le *Pl. knowlesi* à partir de passages sur l'homme (P. G. 4 et 7). Dans ces deux cas, l'inoculation fut bien suivie d'infection, mais celle-ci, observée pendant plusieurs mois, se montra fugace, larvée, n'entraînant aucun trouble morbide, et la guérison survint spontanément chez ces deux animaux sans qu'il fût possible de la réveiller même par la splénectomie qui fut pratiquée chez l'un et l'autre, alors que l'infection avait évolué d'une façon fatale chez tous les autres singes précédemment expérimentés par inoculation directe de singe à singe de ce parasite.

OBSERVATIONS.

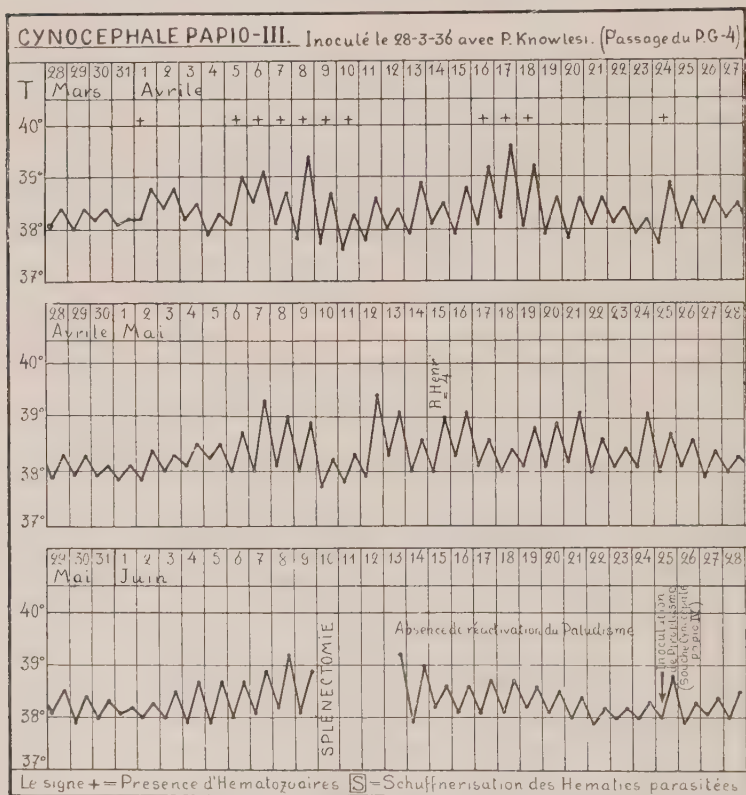
Cynocéphale *papio* III : Inoculé le 28 mars 1936 avec 5 cent. cubes de sang de la P. G. 4, infectée par le *Pl. knowlesi*, par voie intra-musculaire. Observation suivie pendant quatre-vingt-dix-huit jours.

Le 1^{er} avril : apparition des premiers schizontes (incubation : trois jours). Les jours suivants on observe une légère élévation thermique en plateau, les examens de sang étant négatifs. (Graphique 9.)

Réapparition des hématozoaires en petit nombre les 5, 6, 7, 8, 9 et 10 avril, puis les 15, 16, 17 avril, et encore le 24 avril, sans qu'il y ait d'élévation notable de la température. L'état général n'est aucunement perturbé, ni à ce moment, ni par la suite.

Les examens du sang furent constamment négatifs à partir de ce moment.

Le 16 mai, une réaction de Henry pratiquée donne un indice de 4.



GRAPHIQUE 9

Le 10 juin, on essaie de réveiller l'infection par la *splénectomie*. Les suites opératoires furent normales ; aucune élévation de température ne fut observée ultérieurement, et, à aucun moment, on ne put mettre en évidence d'hématozoaires.

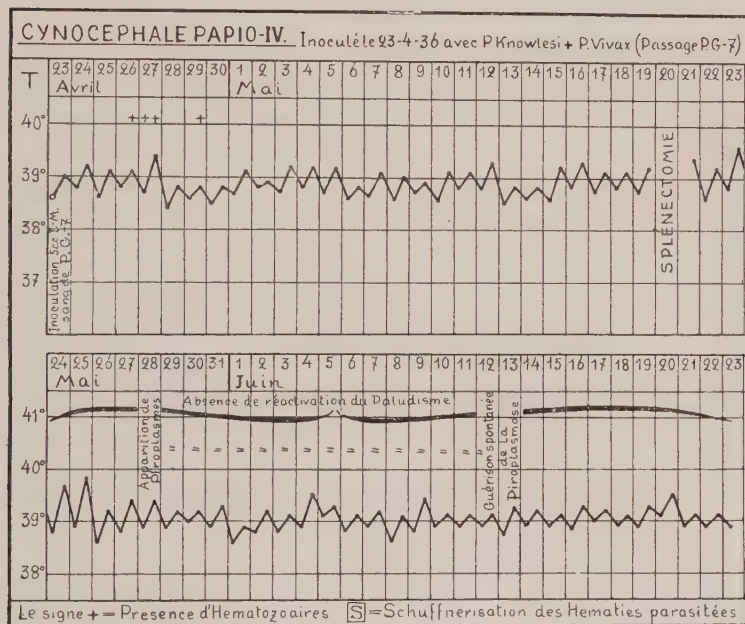
Le 24 juin, l'animal fut inoculé avec une souche de *piroplasmes* provenant du *Cynocephale PapiO IV* (voir observation suivante). Les *piroplasmes* se développèrent abondamment, mais on n'assista à aucun

rechute de l'infection palustre jusqu'à la mort de l'animal qui est survenue le 23 octobre.

Donc, guérison spontanée du paludisme à *Pl. knowlesi* après passage sur l'homme, l'infection ayant toujours été bien tolérée et la pullulation parasitaire étant toujours restée très faible.

Cynocéphale *papio* IV : Inoculé le 23 avril 1936 par voie intra-musculaire avec 5 cent. cubes de sang de la P. G. 7 qui avait été infectée avec le *Pl. knowlesi* et ensuite avec le *Pl. vivax*. Cette tentative avait pour but de tenter la sélection du *Pl. knowlesi* [Graphique 10].

Le 26 avril 1936 : très rares schizontes en goutte épaisse (incubation :



GRAPHIQUE 10.

trois jours). Le 27, on trouve de rares schizontes dans les frottis. La température reste régulière.

Le 29, on retrouve de très rares hématozoaires. Les examens répétés chaque jour se montrèrent, par la suite, constamment négatifs.

Le 22 mai, on tente de réveiller l'infection palustre par la *splénectomie*. Suites opératoires normales; aucun hématozoaire n'apparut par la suite. Mais, le 28 mai, on constate l'apparition de nombreux *piroplasmes* dans le sang. Ces piroplasmes furent retrouvés chaque jour jusqu'au 12 juin, sans que l'animal manifestât de symptômes morbides, ni d'élévation thermique. La persistance des piroplasmes continuait encore par poussées sept mois et demi après. Plusieurs inoculations expérimentales furent faites à partir de ce cas et, en particulier, le Cynocéphale III fut inoculé par ce parasite le 24 juin.

Dans ces deux cas, l'évolution de la piroplasmose ne s'accompagna d'aucun réveil de l'infection palustre.

En résumé, on assista à l'échec de la tentative de sélection du *Pl. knowlesi* par inoculation au singe du double parasite dont était infesté l'homme.

L'infection par le *Pl. knowlesi*, après passage sur l'homme, évolua donc d'une façon tout à fait identique chez ces deux Cynocéphales, mais suivant une modalité très différente de ce qu'était l'évolution de l'infection lorsqu'on la transmettait directement de singe à singe.

Cette différence ne peut pas être attribuée à une résistance spéciale de la race à laquelle appartiennent ces animaux vis-à-vis du parasite, les Cynocéphales I et II s'étant montrés, au contraire, très sensibles à l'infection par cet hématozoaire.

L'invocation d'une résistance individuelle, exceptionnellement marquée de ces singes, paraît difficilement admissible à ce degré. Mais, au contraire, le fait de l'affaiblissement de la vitalité et de la virulence du parasite par le passage humain qu'il a subi, et qui est corroboré par la résistance humaine vis-à-vis de lui, nous paraît beaucoup plus près de la vérité.

En résumé, nous nous trouvons en présence d'un hématozoaire originairement hôte d'une variété de singes inférieurs d'Asie (*Silenus irus*) auquel les autres espèces de singes catarhiniens inférieurs *S. cynomolgus*, *rhesus* et cynocéphales) paraissent également très sensibles.

Expérimentalement, l'infection de l'homme a pu être réalisée par ce *Plasmodium*, à partir du singe. Mais la résistance de l'homme à ce parasite paraît incomparablement plus forte et efficace que celle des simiens, l'infection humaine restant toujours bénigne et fugace. Et le parasite semble perdre, dans cette lutte, une grande partie de sa vitalité et de sa virulence comme en témoignent les essais infructueux de réadaptation ultérieure aux singes sensibles.

Étude morphologique du *Plasmodium knowlesi*.IDENTITÉ MORPHOLOGIQUE DU « *PLASMODIUM KNOWLESI* »
CHEZ SES DIFFÉRENTS HÔTES.

Knowles et Das Gupta, après avoir décrit des différences morphologiques importantes de leur hématozoaire, correspondant aux types réactionnels spéciaux qu'ils attachaient aux diverses espèces de singes inférieurs, furent obligés, à la fin de leur mémoire, d'atténuer leur pensée et décrivirent des formes de transition entre les différents types morphologiques du parasite et des exceptions aux règles qu'ils venaient d'élever.

En reprenant la lecture de leur mémoire et des figures qui y sont exposées, on s'aperçoit que la grande différence, qui semble exister entre les parasites de telle ou telle espèce de singe, tient en fait à la constatation ou non de granulations de type schüffnérien dans les hématies parasitées. Leur présence rapprochant le parasite du *Plasmodium* humain « *vivax* », leur absence le faisant comparer au *Plasmodium falciparum* ou au *Plasmodium malariae*. Une hypertrophie globulaire surajoutée aux granulations de Schüffner paraît, en fait, avoir été moins nettement constatée. On ne peut affirmer, à l'examen des figures de leur mémoire, qu'une déformation de ces hématies.

Pour Sinton et Mulligan les granulations de Schüffner signalent la présence du *P. inui*.

Tout nous porte à croire que la souche qui nous est venue du Professeur Ciuca est une forme *P. knowlesi* pure.

L'expérimentation que nous avons faite nous a permis de reprendre l'étude morphologique complète du parasite et de constater son identité d'aspect chez les singes des diverses races et chez l'homme. En particulier, l'apparition des taches de Schüffner (appelées encore taches de Ziemann, si on utilise, pour les mettre en évidence, la méthode de coloration de Shute) fut relevée à plusieurs reprises chez le *Silenus rhesus* qui, d'après les auteurs anglais, n'en présen-

terait jamais et individualiserait ainsi un type morphologique spécial du parasite, le « type *Rhesus* ». On trouva des granulations de Schüffner chez des animaux des différentes espèces, et nous avons pris soin de relever sur les courbes thermiques les moments d'apparition de ces granulations.

VALEUR DES GRANULATIONS DE TYPE SCHÜFFNÉRIEN
DANS L'INFESTATION DU SANG PAR LE « *PLASMODIUM KNOWLESI* ».

Les granulations de Schüffner ne paraissent pas être un caractère spécifique constamment attaché à ce parasite. Ces granulations ne sont pas constantes, loin de là. Nous avons constaté comme Malamos et Nauck que tantôt on les trouvait en gros grains, tantôt en granulations extrêmement fines ou pas du tout.

Elles nous ont paru plutôt être liées à l'état d'altération plus ou moins grande de l'hématie parasitée, coïncidant avec la pâleur de coloration de l'hémoglobine, et une certaine déformation, plus qu'une hypertrophie, de l'hématie. Et, alors, le parasite lui-même paraît souvent donner des signes de souffrance. Ces granulations furent constatées spécialement, et ceci dans les différentes espèces animales, à l'acmé et au déclin des accès fébriles, coïncidant exactement avec le moment de destruction des hématies parasitées, décrit par ailleurs. De plus, elles existaient surtout dans les hématies dont les parasites étaient arrivés à un stade de développement assez avancé.

Cycle évolutif du *Plasmodium knowlesi*.

Les schizontes annulaires fins ressemblent à ceux du *Pl. falciparum* humain ; ils émettent rapidement des pseudopodes linéaires très ramifiés, puis deviennent moins mobiles et présentent un stade grégariniforme.

La distinction se fait rapidement entre l'évolution vers la schizogonie ou vers la gamétogonie.

Dans la schizogonie, on peut suivre tous les stades de la division de la chromatine jusqu'à la formation de la rosace

mûre qui comporte 7 à 9 mérozoïtes disposés en grappe, excentriquement par rapport à la masse protoplasmique qui contient 1 ou 2 gros grains de pigment. L'aspect morphologique des gamètes est comparable à celui des gamètes du *Pl. malariae* de l'homme, mais le pigment reste en grains plus fins et moins abondants que chez ce parasite.

INTERVENTION PROBABLE D'UNE DIVISION PARTHÉNOGÉNÉTIQUE DES MACROGAMÈTES DANS LA MULTIPLICATION DES PARASITES.

Les gamètes se sont toujours montrés plus nombreux que les formes d'évolution schizogoniques. Ainsi que Knowles et Das Gupta l'avaient déjà signalé, on observe, au moment où les hématozoaires arrivent à maturation, de très nombreux macrogamètes binucléés. En suivant systématiquement leur évolution, on constate le début de la séparation du cytoplasme en deux masses correspondant à chacun des deux noyaux ; l'évolution ultérieure, plus difficile à suivre, montre qu'un des noyaux paraît entrer en division tandis que l'autre devient pâle et semble dégénérer. Les figures suivantes, fréquemment trouvées, sont malheureusement d'interprétation plus difficile, car elles montrent l'infestation d'une hématie par un macrogamète + un macrogamète, ou un macrogamète + une rosace, et peuvent être prises aussi bien pour une infestation double de l'hématie, que pour la fin d'un cycle de division parthénogénétique d'un macrogamète.

Le fait que, dans le cycle parasitaire quotidien, les gamètes disparaissent du sang en même temps que les rosaces, pour être remplacés par de jeunes schizontes annulaires ; le fait que l'examen des organes profonds, soit par ponction, soit à la suite d'autopsies, montre que les hématozoaires s'y trouvent à un stade de développement correspondant à ceux du sang périphérique, et qu'on ne peut y déceler de mise en réserve des gamètes sont pour nous, en venant à l'appui des figures de segmentation que nous avons pu suivre, des arguments sérieux en faveur de la possibilité d'une division parthénogénétique des macrogamètes évoluant concurremment à la division schizogonique.

Durée du cycle évolutif du *Plasmodium knowlesi*.

LA DURÉE DU CYCLE PARASITAIRE EST DE VINGT HEURES.

La détermination de la durée du cycle évolutif du *Pl. knowlesi* ne peut être basée sur la périodicité des accès fébriles qui se montre très variable, et, de toute évidence, n'est pas rythmée sur l'évolution du cycle parasitaire.

Les seules observations valables ne peuvent donc partir que de l'examen direct du parasite. Knowles et Das Gupta, comparant dans un cas les moments d'infestation du sang par les jeunes schizontes et leur multiplication, ont établi la probabilité d'un cycle parasitaire de vingt-quatre heures.

L'observation du *Macacus cynomolgus* II nous a permis de suivre, pendant une longue période, les différents stades du cycle parasitaire et d'en étudier l'horaire avec plus de précision.

La première constatation fut que chez cet animal, à partir du 6 mars 1936, on trouva, le matin, une grande abondance de rosaces et de gamètes en voie de maturation, à l'exclusion de schizontes jeunes, alors que le soir ces formes avancées avaient disparu pour faire place à d'innombrables schizontes annulaires fins et quelques trophozoïtes au début de leur segmentation.

L'étude de ces parasites, suivie chaque jour, nous a permis de constater un léger décalage dans l'horaire de ce cycle qui avançait, régulièrement chaque jour, si bien qu'on arrive à avoir le matin la présence de jeunes schizontes et, l'après-midi, celle de rosaces et des gamètes évolués. Cette demi-révolution du cycle se fit en dix jours (cycle inversé complètement le 16 mars 1936). Ceci mettrait la révolution complète en vingt jours, donnant une avance de quatre jours (quatre-vingt-seize heures sur le cycle de vingt-quatre heures habituellement admis). Ce gain de quatre-vingt-seize heures sur vingt-quatre jours nous donne un gain de quatre heures par jour, ce qui ramène le cycle parasitaire à vingt heures entre une schizogonie et la suivante.

Conclusions.

Il ressort de cette étude que :

1° La durée du cycle évolutif du *Pl. knowlesi* paraît être de vingt heures et non de vingt-quatre heures comme pensaient l'avoir établi Sinton et Mulligan.

2° L'aspect morphologique de cet hématozoaire est identique chez les différents hôtes où il se développe : qu'il s'agisse des singes des diverses espèces de la famille des *Cercopithecidae* ou de l'homme. Les variations morphologiques décrites par les auteurs anglais tiennent à la présence ou à l'absence de granulations de type schüffnérien dans les hématies parasitées. Ces granulations de taille variée paraissent être un caractère accidentel lié à l'état d'altération plus ou moins grande de ces hématies.

3° Le *Plasmodium knowlesi*, originairement parasite des singes de l'espèce *S. irus*, est infectant et pathogène pour les diverses espèces de singes de la grande famille des *Cercopithecidae* (macaques, cercopithèques, cynocéphales). Les variations de sensibilité, notées dans les différents cas, doivent être imputées à des modalités réactionnelles individuelles plutôt qu'à des différences de races.

4° Le *Plasmodium knowlesi* est également infectant et pathogène pour l'homme. Mais la résistance de l'homme est bien plus grande que celle du singe : l'adaptation du parasite à ce nouvel hôte expérimental est difficile, la maladie produite est bénigne, et la tendance à la guérison habituelle. L'hématozoaire lui-même paraît supporter avec difficulté ce séjour chez l'homme ; il y perd en vitalité, en virulence, et n'arrive plus que difficilement à se réadapter normalement au singe.

5° Mesnil et Roubaud concluent, en 1920, qu'un *Plasmodium* déterminé ne s'attaque qu'à une seule espèce ou à un petit nombre d'espèces voisines.

Pour le *Plasmodium knowlesi*, il faudrait élargir cette notion de spécificité, en notant toutefois que l'homme se trouve à la limite de la résistance à l'infection par ce parasite du singe.

BIBLIOGRAPHIE

- CIUCA (M.), BALLIF (L.), CHELARESCO (M.), LAYRINENKO (M.) et ZOTTA (E.), *Bull. Soc. Path. Exot.*, n° 3, mars 1937 (à paraître).
- HUBERT (C.), CLARK et LAWRENCE DUM. Experimental efforts to transfer Monkey Malaria to Man. *Americ. Journ. of Trop. Med.*, **11**, janvier 1931, p. 1 à 10.
- IONESCO (C), MIHAIESTI, ZOTTA (G.), E. RADACOVICI et BENDSKI (G.). Transmission expérimentale à l'homme du paludisme propre aux singes. *Soc. Biolog. Bucarest*, 15 février 1934.
- KNOWLES. Monkey Malaria. *Annual Rep., Calcutta sets Trop. Med. Inst. of Hyg. a. Carmichael Hosp., F. Trop. Dis.*, 1931.
- KNOWLES et DAS GUPTA. A study of Monkey Malaria and its experimental transmission to man. A preliminary report. *Indian Med. Gazette*, **62**, n° 6, juin 1932, p. 301 à 320.
- KRISHNAN, SMITH et CHIRANDILAL. Contribution to protozoal immunity. Part I. The effects of splenectomy on the course of malarian infection in Monkeys. *Ind. Journal Med. Res.*, **21**, n° 2, 1933, p. 343 à 352.
- KRISHNAN, SMITH et SAL (CH.). Contribution to protozoal immunity. Part II. Immunity to malaria in Monkeys and the effect of splenectomy on it. *Ind. Journal Med. Res.*, **21**, n° 3, 1934, p. 639 à 647.
- MALAMOS (B.) et NAUCK (E.-G.). *Zent. f. bakt. Refer.*, **117**, 1935.
- MAGINESCU. Tentativi di trasmissione della malaria alla scimmia ed al coniglio. *Rivista di Malarologia*, **8**, 1929.
- MESNIL et ROUBAUD. Essais d'inoculation du paludisme au chimpanzé. *Ces Annales*, **34**, janvier 1920, p. 466.
- MULLIGAN et SINTON. Studies immunity in Malaria. Part III. Multiples surinfections with various strains of *Plasm. knowlesi*. *Rec. Malar. Surv. of India*, **3**, n° 4, 1933, p. 809 à 839.
- MULLIGAN (H.-W.). *Arch. f. Protistenk.*, **84**, 1935.
- NAPIER et CAMPBELL. Observations on a plasmodium infection with causes hemoglobinuria in certain species of Monkey. *Ind. Med. Gazette*, **68**, n° 5, 1932, p. 246.
- NAUCK (E.-G.). *Verhandl. Deutsch. Path. Gesellsch.*, **27**, 1934.
- NICOL (W. D.). Monkey Malaria in G.P.I. *Brit. Med. Journal*, 19 octobre 1935, p. 760.
- SINTON (J. A.). Studies on immunity in malaria. Part V. The nature of the tolerance shown by *Silenus irus* to infection with *Pl. knowlesi*. *Rec. Malar. Surv. of India*, **5**, n° 4, 1935, p. 501 à 521.
- SINTON (J.-A.) et MULLIGAN (H.-W.). *Rec. Mal. Surv. Ind.*, **3**, n° 2.
- SINTON (J.-A.) et MULLIGAN (H.-W.). *Rec. Mal. Surv. Ind.*, **3**, n° 3, p. 381-443 et 529-568.
- SINTON (J.-A.) et MULLIGAN (H.-W.). *Rec. Mal. Surv. Ind.*, **3**, n° 4.
- VAN ROOGEN et PILE. Observations on infection by *Pl. knowlesi* (Ape Malaria) in treatment of general paralysis of the insane. *Brit. Med. Journal*, 12 octobre 1935, p. 662 à 666.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Schizogonie.

- 1, Schizonte annulaire fin.
- 1 *bis*, Schizonte annulaire fin.
- 2, Schizonte annulaire épais avec quelques granulations rouges dans l'hématie.
- 2 *bis*, Schizonte annulaire épais avec granulations de Schüffner.
- 3, Stade amiboïde fin.
- 3 *bis*, Stade amiboïde fin.
- 4, Stade grégariniforme, quelques granulations de Schüffner.
- 5, Stade amiboïde épais, le parasite pâle et fragmenté paraît en voie de dégénérescence et l'hématie est ponctuée de granulations de Schüffner.
- 6, Infestation double d'une hématie par un schizonte épais et par un schizonte en voie de dégénérescence (protoplasme et noyau fragmentés).
- 7, Trophozoïte, début de fragmentation du noyau.
- 8, Début d'organisation d'une rosace, parasite en état de dégénérescence, et hématie ponctuée de granulations de Schüffner.
- 8 *bis*, Début d'organisation de la rosace, rassemblement de l'hémozoïne en amas.
- 9, Rosace mûre à 7 mérozoïtes disposés en grappe appendue à un protoplasme excentrique contenant de gros grains de pigment.
- 10, Rosace mûre à 9 mérozoïtes, même disposition.

Gamétogonie.

- I, Jeune schizonte évoluant vers la gamétogonie.
- II, Jeune gamète au stade grégariniforme.
- III, Jeune gamète arrondi.
- III *bis*, Jeune gamète en bande équatoriale.
- IV, Macrogamète adulte.
- IV *bis*, Macrogamète adulte avec granulations de Schüffner dans l'hématie.
- V, Microgamétocyte adulte.

Figures de parthénogénèse probable des macrogamètes.

- VI, Binucléation d'un macrogamète; répartition du pigment en bande longitudinale entre les deux noyaux.
- VI *bis*, Même aspect, granulations de Schüffner.
- VII, Début de division du cytoplasme d'un macrogamète binucléé.
- VIII, Début de segmentation d'un des noyaux d'un macrogamète binucléé, et dégénérescence du noyau résiduel.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE LA MICROFLORE NITRIFICATRICE
DES BOUES ACTIVÉES DE PARIS

par HÉLÈNE WINOGRADSKY.

(*Institut Pasteur, Brie-Comte-Robert.*)

Depuis qu'il a été démontré par une suite de recherches, exécutées par des auteurs anglais et américains (Fowler, Adenay, Ardern, Lockett, Bartow, Buswell, Long et bien d'autres [1 à 13], que la boue en suspension dans l'eau d'égout, soumise à une aération forcée, acquiert avec le temps la propriété d'épurer cette eau, le problème s'est posé de savoir quels sont la nature et le mode d'action des facteurs qui produisent cette épuration. Ce qui frappait dans ce cas, c'est la rapidité et l'intensité de l'action épuratrice de cette *boue activée* (*activated sludge*), laquelle, mise au point, devient un agent puissant d'épuration applicable à la pratique sanitaire.

En France, Diénert [14, 19, 20, 22] a étudié principalement la formation ou « activation » de cette boue, l'allure du processus, l'effet de la température, de la présence de CaCO_3 dans le milieu; la proportion boue — eau d'égout la plus efficace; le pouvoir nitrificateur de boues de différentes provenances.

Courmont, Rochaix et collaborateurs [15, 21, 23, 24, 25] ont dirigé leurs recherches sur la microflore de la boue et sur la décomposition des matières organiques, sur le rythme de la disparition de l'ammoniac, sans s'occuper des agents de la nitrification.

Cavel [26] a démontré l'influence de la réaction du milieu, de son pH , sur le processus.

Cambier [16, 17, 18], à la suite d'expériences étendues sur l'épuration des eaux d'égout par les boues activées

(provenant de l'usine de Colombes), ne croit pas devoir admettre, comme on le fait généralement, que cette remarquable action épuratrice est due à un facteur biologique, ou, comme il dit, s'exerce suivant le mécanisme de la fermentation nitrique. D'après Schloesing et Müntz, celle-ci serait nulle à 5°, ne commençant qu'à 12°, tandis que dans ses expériences, même à 0°, l'épuration est complète, la nitrification est simplement retardée; à 5°, elle est complète en quatre heures. Du reste, cette nitrification se différencie de la « classique nitrification microbienne » par son intensité. Quant à l'argument tiré de l'action empêchante du chloroforme (Schloesing et Müntz), il ne paraît pas valable dans ce cas, car déjà des doses minimales, telles que 1/18.000, apportent une gêne marquée à l'épuration, tandis que d'autres espèces microbiennes (Bacille d'Eberth, levure de bière), se développent normalement à des doses atteignant 1/300 et 1/500. Il suffirait même de chloroformer l'eau d'égout *sans boue* et de n'ajouter de la boue activée qu'après une bonne ventilation de l'eau, pour prévenir toute nitrification. En vue de cette sensibilité, en quelque sorte exagérée et sans analogie dans le monde des microbes, il serait difficile d'invoquer l'action antiseptique du chloroforme pour affirmer la nature microbienne de la nitrification par la boue activée. Enfin, les essais qu'il a effectués pour isoler les ferments nitriques de la boue en milieux chargés de nitrite, suivant les indications de Winogradsky, ne l'auraient conduit à aucun résultat positif.

L'ingérence de l'agent microbien devenue douteuse pour cet auteur, il tend à attribuer l'effet oxydant à un facteur purement chimique. Après s'être assuré par des expériences concluantes qu'une dose convenable de fer sous forme de sulfure est indispensable à la nitrification, il est conduit à lui attribuer un rôle de premier plan en qualité de catalyseur.

Je regrette qu'il ne m'ait pas été possible de répéter les expériences intéressantes de M. Cambier, se rapportant à une nitrification active aux basses températures de 0° à 5°, ainsi qu'à l'effet du chloroforme sur le phénomène, et cela pour la simple raison que la matière en question m'a manqué. C'est

cette même raison, la difficulté d'avoir à ma disposition la provision nécessaire de boue activée provenant de l'usine, qui ne m'a pas permis d'étudier la nature de la boue et les phénomènes qui s'y développent au cours de son activation.

Ce n'est qu'un seul échantillon provenant de l'usine de Colombes, dû à l'obligeance de M. Cambier, qui a servi à toutes mes observations relatées dans ce mémoire.

On s'est mis immédiatement à y rechercher les microbes spécifiques de la nitrification et de la nitrification. Leur présence et leur activité paraissaient très probables, malgré l'avis contraire de M. Cambier et l'attitude indécise de plusieurs autres observateurs.

En effet, l'expérience, longue d'un demi-siècle, a déjà confirmé tant de fois que les phénomènes de nitrification et de nitrification de quelque intensité sont toujours agencés par les organismes spécifiques. Le processus étant ici particulièrement intense, il n'y avait que raison de plus de s'attendre à leur ingérence dans ce cas spécial.

On sait que les microbes spécifiques découverts par Winogradsky ont été couramment isolés des filtres biologiques. En se servant du procédé indiqué par cet auteur, on a toujours décelé des espèces identiques, ou se rapprochant de la Nitrosomonade et du Nitrobacter. Il est bien naturel que la même cause ait été invoquée dans les recherches sur la boue activée, mais il ne paraît pas que l'on soit arrivé à un résultat bien déterminé. Du moins, il nous a été impossible de trouver des indications tant soit peu précises là-dessus dans la littérature, bien volumineuse, traitant de la question.

Quant à la méthode à employer dans ce cas, ce n'est que le procédé nouveau, élaboré au laboratoire de Brie-Comte-Robert en 1932-1933 [27], qui promettait succès. En effet, en se servant de l'ancien procédé de Winogradsky, on n'a aucun moyen sûr de juger de la densité des microbes spécifiques dans le milieu. Supposons que la solution standard ensemencée avec de la boue activée arrive à la nitrification et à la nitrification : pourrait-on conclure que le processus provoqué par les boues dans l'eau d'égout soit dû à l'action des microbes qui ont pullulé dans la fiole? La conclusion serait peu solide, car quelques germes latents se trouvant par hasard dans la boue au-

raient pu aussi bien provoquer le processus dans une solution appropriée. Il est évident que seule une détermination de la densité des germes de nitrification dans *la boue même*, fraîchement sortie de l'usine, pourrait nous donner une réponse à la question de savoir si les germes nitrificateurs y sont responsables du phénomène exceptionnellement intense que cette boue provoque. L'activité des pullulations microbiennes étant toujours grossièrement, mais assez nettement proportionnée à la densité de la population, une densité faible, telle qu'on la trouve, par exemple, dans les milieux naturels, ne saurait encore être considérée comme un argument en faveur de la cause biologique; par contre, une densité extra-forte, comme on ne la trouve jamais en dehors de ces boues, devrait être envisagée comme un caractère bien en rapport avec l'intensité du phénomène provoqué; par conséquent, comme un indice démonstratif en faveur de la cause biologique.

Ce caractère de densité extraordinaire a été observé en réalité dès les premiers essais (1). La tâche s'est donc imposée immédiatement, de tenter d'isoler les souches actives et d'étudier leurs caractères.

Ce travail aurait été infiniment long et compliqué, si on s'était servi de l'ancien procédé de Winogradsky qui comporte: une culture d'enrichissement dans une solution appropriée, isolement sur plaques silico-gel, culture pure en solution pour éprouver l'activité des souches pures. Ajoutons que dans le cas d'un mélange de nombreuses souches douées d'une fonction identique, la méthode ne présente que peu de chances de les dissocier avec succès assez complètement. Tandis qu'au moyen du nouveau procédé simplifié, il a été possible de s'assurer d'emblée qu'il s'agit là de toute une microflore spécifique du milieu, composée de deux groupes: les microbes de la nitrification, et ceux de la nitratisation.

MÉTHODE. — Rappelons en quelques mots la méthode qui a été décrite avec tous les détails dans le VII^e mémoire des

(1) Les premiers résultats ont été résumés dans une note parue dans *C. R. Ac. Sc.*, séance du 27 mai 1935, et dans une communication au Congrès de l'Ass. Int. de la Science du Sol, à Oxford, 1935 [28, 29].

« Etudes sur la Microbiologie du sol » (Ces *Annales*, 50, 1933, p. 330) [27].

Dans le présent travail on s'est servi des plaques silico-gel de 10 centimètres, et, au besoin, de 20 centimètres de diamètre.

Pour les microbes de la nitrification, les plaques sont imprégnées d'une solution saline additionnée de sulfate d'ammoniac.

La solution saline est composée comme suit :

	GRAMMES
Phosphate bipotassique	0,5
Sulfate de magnésie	0,3
Chlorure de sodium	0,3
Sulfate ferreux	0,02
Sulfate de manganèse	0,02
Traces de sels de zinc, de molybdène, de titane et d'aluminium.	
Eau de robinet, en centimètres cubes	200

La solution de sulfate d'ammoniac contient 50 milligrammes de sel par centimètre cube.

Pour une boîte de 10 centimètres de diamètre, on prend 2 cent. cubes de solution saline et 1 cent. cube de solution ammoniacale.

Pour une boîte de 20 centimètres de diamètre, les volumes sont quintuplés.

On jette la solution bouillante sur la plaque, en ayant soin de ne pas endommager la couche du gel, on évapore la nappe liquide en laissant la boîte ouverte sur la plaque métallique de l'étuve de Roux à environ 40°. Ensuite, on émaille la plaque en prenant 1 gramme de carbonate de chaux ou, dans des cas plus rares, 0 gr. 3 de carbonate de magnésie léger pour une plaque de 10 centimètres de diamètre. Les poudres doivent être soigneusement triturées dans un petit mortier, préalablement flambé, additionnées d'un minimum d'eau distillée bouillante et la suspension versée sur la plaque. Par de légers mouvements rotatifs, on la répand aussi uniformément que possible sur toute la surface et l'on chasse l'excès du liquide sur la même plaque métallique.

Pour la nitrification, les plaques reçoivent 30 milligrammes de nitrite de potasse et un émail fait de poudre de kaolin avec 0 gr. 1 de CaCO_3 .

Dans la suite, une dose plus forte de fer s'est montrée nettement favorable. Des quatre préparations de fer éprouvées —

le fer réduit à l'hydrogène, le sulfure de fer, l'oxalate ferreux ammoniacal, et l'oxalate ferrique — c'est le dernier qui a paru donner les meilleurs résultats. On l'ajoutait à la dose de 2 milligrammes par plaque de 10 centimètres, en même temps qu'une faible dose de solution humique. La différence au profit de ces plaques riches en fer était toujours bien appréciable à l'œil nu ainsi que sous le microscope.

On a commencé par ensemercer les plaques ammoniacales avec 1 cent. cube d'une suspension à 1/100 de boue de Colombes dans de l'eau de robinet stérilisée. On mélangeait intimement la dose de la suspension avec une bouillie crémeuse de poudre, on laissait couler le mélange sur la plaque, on évaporait à point à une température de 25° à 30°. Même procédé pour les plaques nitritées, sauf émail en kaolin.

Sur les plaques à ammoniac, les végétations spécifiques apparaissaient au bout d'environ dix jours sous l'aspect de plages d'éclaircissement, ou dissolution, du carbonate, comme cela a été décrit (*loc. cit.* [27]). Ces plages indiquent tout de suite la fonction des colonies parues, laquelle ne peut être que celle de la production d'acide nitreux; ceci est confirmé par l'intensité croissante jusqu'au maximum de la réaction de Trommsdorf, que l'on éprouve en jetant un petit morceau du gel dans le réactif, et par la disparition concomitante de la réaction de Nessler éprouvée de la même manière. Il n'y a lieu ensuite que de repiquer ces végétations sur le même milieu et de les soumettre à une étude microscopique réitérée pour les différencier et pour établir leurs caractères, ainsi que pour s'assurer dans la suite que ces caractères restent constants.

Sur les plaques nitritées émaillées de kaolin, les végétations apparaissent plus lentement; la fonction de chacune des colonies n'est pas si manifeste du premier coup d'œil, comme dans le cas précédent; mais là aussi il est possible d'établir leur fonction nitratante en ayant soin de réduire au possible le nombre des colonies par plaque et en suivant l'évanouissement de la réaction de Trommsdorf.

Les premières plaquesensemencées à 1/100 présentaient une surface criblée de points de corrosion innombrables, ou couverte de menues colonies en perles et gouttes de mucus également innombrables. Il a fallu recourir avec la boue origi-

nale à des dilutions plus hautes, allant jusqu'à 1/100.000.000. dilution qui donnait enfin des colonies assez séparées, pour pouvoir les étudier à part.

Quant à l'épuration des végétations spécifiques, jusqu'à ce qu'elles soient libres de tout germe banal, cette épuration, si laborieuse et en même temps si aléatoire, est tout simplement négligeable dans ce cas, les quelques germes étrangers à l'état latent ne pouvant gêner d'aucune façon l'étude morphologique, ni même physiologique. Du reste, les végétations zoogléliques dont il s'agit, ne se prêteraient pas à cette opération. et il y a toutes chances que les efforts dans cette direction soient peine perdue.

Pour l'étude microscopique de ces organismes, le choix d'une méthode convenable de coloration est d'une importance majeure. En se servant de colorants basiques classiques, préconisés dans les manuels, on ne saurait se faire aucune idée sur la structure de ces masses zoogléliques, souvent relativement volumineuses; on ne verrait que des masses surcolorées, opaques, où les corps bactériens, sans parler de leur groupement, seraient impossibles à distinguer. L'usage d'un colorant acide est obligatoire. On s'est servi au début du *Violet sulfo* et de l'*Erythrosine extra phéniquée*, mais le colorant proposé par Romell, le *Fast Acid Blue R* (2) phéniqué, s'est montré nettement supérieur. On le fait agir quelques minutes. on lave et recolore quinze à trente secondes avec une solution aqueuse de *Vésuvine*. Les corps bactériens se présentent colorés en bleu indigo, presque noir, toutes les enveloppes et la glaire, où les cellules sont logées, colorées en jaune intense. Le tableau est d'une netteté parfaite, comme on peut voir sur les microphotographies prises par M. Jeantet sur nos préparations.

Au moyen du procédé décrit, il m'a été possible d'isoler de l'échantillon unique de boue activée de Colombes qui m'est parvenu, les formes de microbes nitrificateurs dont on trouve la caractéristique dans la suite.

On en a isolé en tout sept formes de Nitrosobactéries, dont

(2) L'échantillon nous a été livré obligeamment par la *General Dye-stuff Corporation*, de New-York.

deux ont été perdues au cours des repiquages. Quant à leurs caractères morphologiques, on a isolé et maintenu en culture une souche de *Nitrosomonas* et une souche de *Nitrosocystis*, les deux très rapprochées de celles qui peuplent ordinairement le sol. En plus, trois espèces nouvelles, se caractérisant par leur végétation zoogléique, classées dans un *n. g.*, que l'on a cru devoir créer et pour lequel la dénomination de *Nitrosogloea* est proposée. On les désigne : *N. merismoides*, *N. schizobacteroides*, et *N. membranacea*.

Il a été inattendu d'y découvrir deux nouvelles espèces de microbes de la nitratisation, caractérisées également par leur végétation zoogléique, les deux comprises dans le genre *Nitrocystis*, *n. g.* Jusqu'à présent une seule forme de *Nitrobacter* était connue, que l'on retrouvait partout : le *Nitrobacter*, forme à cellules libres.

En général, ce genre de pullulation en masse zoogléique paraît spécial à la microflore nitrificatrice des boues activées. Les cellules toujours grégaires, forment tantôt des membranes, tantôt des corps vaguement arrondis, à structure homogène, ou bien à groupements divers. Il aurait été impossible de différencier ces espèces zoogléiques sans avoir étudié la structure de leurs colonies.

La culture de ces organismes a été conduite non seulement sur des plaques de silico-gel, mais aussi dans un grand volume de solution aérée par barbotage de l'air, c'est-à-dire dans des conditions imitant le procédé d'activation de la boue. On a opéré avec un mélange de colonies isolées, prises sur gel. La dose d'azote ammoniacal était équivalente à 40 milligrammes de sulfate d'ammoniac que l'on renouvelait à mesure de son oxydation. On a observé : 1° l'accélération du processus d'oxydation avec chaque nouvelle dose d'ammoniac, les délais nécessaires à l'oxydation de la même dose d'azote ammoniacal ayant été successivement de 17 jours, 9 jours et 7 jours; 2° une nitritation de l'azote après la première dose, suivie d'une nitratisation *directe* à partir de la seconde; 3° l'effet favorable des humates et du fer sur le processus.

On a dû se borner à cette expérience incomplète, pour la raison qu'une expérience d'activation comparée avec de la boue ne pouvait être exécutée par manque de matériel. On

notera tout de même que le mélange de colonies isolées sur gel a subi facilement un commencement d'activation assez marquée dans le même sens que cela a été obtenu avec de la boue.

Description des souches isolées de la boue.

GROUPE DE NITROSOBACTÉRIES.

Nitrosomonas souche B. A. — Forme des cellules en bâtonnet à bouts arrondis, longs de $1\ \mu$ environ (v. pl. III, photos 7 et 9). Produit sur les plages de dissolution de CaCO_3 un mucus couleur rouille, tournant au brun sépia à mesure du vieillissement de la culture. Présente tous les caractères du genre, à savoir : cellules libres, sporadiquement mobiles au moyen d'un cil terminal; formant parfois des amas assez denses, sans que les cellules soient liées entre elles par une glaire résistante. Diffère peu des cinq souches isolées en 1933 du sol (souches a, b, c, d, e [27]), par la forme des cellules, mais se distingue par la coloration rouille ou brun rougeâtre de ses colonies sur gel carbonaté. Il paraît donc préférable de la classer comme une souche distincte désignée B. A. (boue activée).

Nitrosocystis souche B. A. — Caractères macroscopiques semblables aux souches isolées du sol. Ainsi qu'il a été décrit dans le mémoire cité, les colonies se présentent sur les plaques sous forme de corpuscules compacts, hulbeux, bosselés, d'un jaune rougeâtre, entourés d'une zone d'éclaircissement sur le gel émaillé de CaCO_3 . Les corpuscules sont composés de cellules ovales ou allongées cocciformes; ils sont habillés d'une capsule, ou enveloppe, plus ou moins épaisse. On en trouve qui sont munis d'une membrane particulièrement résistante, même dure, composée de deux couches : formations à caractère kystique qui sont probablement des états de repos ou de conservation. Périodiquement, les colonies naturelles se dispersent, les cellules devenant mobiles pour un temps très court et très difficile à saisir; puis se reforment à nouveau par multiplication des cellules libérées. Si leur formation a lieu à la suite d'une division dans trois

directions de l'espace, ou bien le groupe dense des cellules se moule en corpuscules arrondis sous l'effet de la pression de ces mêmes cellules qui sont emprisonnées dans une capsule commune, — il est bien difficile d'en décider.

De la souche répandue dans le sol, la souche trouvée dans l'échantillon se distingue par la teinte jaune rougeâtre très pâle des colonies et la forme des cellules, qui est ovale : $1,5\ \mu$ sur $0,5\ \mu$. Pour tenir compte de cette différence, peu marquée, on la désigne de *Souche B. A.* (v. pl. I, photos 4 et 5).

Nitrosogloea, n. g. — Végétation toujours sous forme de zooglée. Les trois espèces isolées se différencient nettement par la forme des cellules et par leur groupement.

1° *N. merismoides*. — Végétation en membrane, à surface terne et granuleuse, d'une teinte jaune pâle. Structure caractérisée par le groupement des cellules, cocciformes ou légèrement allongées, en *tétrades mérismatiques*, chacune munie de sa membrane propre. Ces tétrades, accotées l'une à l'autre, forment des figures variées, tantôt étirées en chaînettes ramifiées, en zigzag, tantôt plus compactes dans des cultures âgées (v. pl. II, photo 2).

2° *N. schizobacteroides*. — L'aspect des colonies sur gel rappelle celui de l'espèce précédente. Composées de courts filaments de $3\ \mu$ à $4\ \mu$ qui se divisent transversalement en articles aplatis, lesquels s'arrondissent en cocci, restant réunis dans une gaine commune. Les filaments s'enchevêtrent formant une sorte de pseudo-tissu (à la façon des champignons), assez résistant pour que l'on en puisse enlever des lambeaux par le bout de l'aiguille (v. pl. II, photos 1, 3, 3a).

3° *N. membranacea*. — Produit de petits points de dissolution criblant l'émail de la plaque ; les points apparaissent couverts d'un mucus terne, opaque, d'une teinte beige pâle. Il est assez résistant pour que la colonie entière s'enlève par la pointe de l'aiguille; elle est difficile à déchiqueter, malgré l'élasticité de la masse. A l'étude microscopique, elle apparaît formée de cellules coccoïdes, en diplocoques, rangés en 3 à 4 couches, de structure uniforme, c'est-à-dire, sans différenciation en groupes séparés (v. pl. II, photo 6).

GROUPE DES NITROBACTÉRIES.

Les deux formes nouvelles, isolées de la boue, se différencient assez nettement du *Nitrobacter* classique. Celui-ci pulvule toujours en cellules *libres*, minuscules, en forme de coin, produisant un mucus semi-liquide, jamais de masses compactes zooglées. Tandis que les deux espèces en question se caractérisent justement par leur végétation en *colonies compactes*.

1° *Nitrocystis sarcinoides*, *n. g. et sp.* — Les végétations apparaissent sur la surface de la plaque kaolinée sous forme de petites verrues, de couleur ambre, qui s'élèvent au-dessus de la couche kaolinée. Leur consistance est telle qu'on peut les enlever entières avec la pointe de l'aiguille et les replanter sur la surface d'une plaque nouvelle, où elles continuent à s'agrandir, atteignant jusqu'à 2 mm. 5 de diamètre. Elles brunissent avec l'âge en se rétrécissant et en devenant dures comme des écailles. En étudiant les colonies jeunes disloquées par une légère pression, on distingue très bien la structure des colonies : elles sont composées d'articles ellipsoïdes, de forme quelque peu dyssymétrique, en coin, longs d'environ 1 μ , groupés en paquets sarcinoïdes, arrondis, qui s'accotent en formant des masses relativement volumineuses. Avec l'âge, la colonie s'aplatit et devient entièrement opaque ; elle porte alors une enveloppe de glaire épaisse à plusieurs couches (v. pl. III, photos 8, 10 et 11).

2° *N. micropunctata*, *n. sp.* (3). — L'aspect macroscopique des végétations ressemble à celui de l'espèce précédente : les mêmes petites verrues surgissant sur la couche kaolinée ; mais leur teinte est plus claire et leur consistance plus plastique. Les cellules sont minuscules n'excédant pas 0,5 μ de diamètre, la forme en bâtonnet ellipsoïde ne se colorant qu'aux extrémités, de sorte qu'un groupe de cellules disséminées se présente comme un amas de granules punctifor-

(3) Dans la communication préliminaire [28], l'espèce était désignée *Nitrogloea micropunctata*. Dans la suite, on s'est assuré qu'il est préférable de ne pas créer un nouveau genre, les deux formes zooglées étant assez rapprochées pour les classer dans un seul.

mes, où il est malaisé de discerner les contours des corps bactériens. Quant à la structure des colonies, il est probable qu'elle est pareille à celle de l'espèce précédente. Seulement, cette structure n'apparaît pas assez prononcée, la masse ne résistait pas si bien à la dislocation causée par la préparation. Voir pl. III, photos 12 et 13. Sur la dernière la structure en paquet est plus ou moins nette, malgré la dislocation. Les colonies âgées, généralement aplaties, oviformes, sont plus résistantes, quoique démunies de capsules bien différenciées.

*
* *

L'auteur doit se contenter actuellement de cette brève caractéristique des formes microbiennes trouvées dans la boue de l'usine de Colombes. L'étude des microbes nitrificateurs étant généralement fort lente et laborieuse, des expériences plus complètes auraient pris encore un temps assez long, ce qui a amené la décision de publier sans plus tarder les résultats acquis jusqu'à ce jour. Ils suffisent pour donner une idée assez précise de la microflore nitrificatrice de ce milieu spécial. Ils sont de nature à enlever les doutes qui subsistent encore sur le rôle des microbes de la nitrification dans ce cas. Le problème, en ce qui concerne la nature biologique du processus provoqué par la boue activée, apparaît donc comme définitivement résolu.

Revenons une fois de plus à la composition de cette microflore spéciale, notamment sur le fait de la prédominance des formes zoogléiques, dont la présence ni l'activité n'ont jamais été constatées au sein du sol, malgré des essais bien nombreux. Cette différence conduit à rechercher les facteurs qui la déterminent. Là, il semble qu'il y aurait raison d'envisager cette forme de végétation comme une adaptation aux conditions qui sont propres à l'habitat. Celui-ci est, comme on le sait, toujours plus ou moins chargé de substances organiques diverses. Or, il a été établi depuis longtemps que ces substances sont non seulement inassimilables pour le groupe d'autotrophes, que sont les nitrificateurs, mais que leur action est enrayée par l'effet de ces substances, déjà à des concentrations très faibles. Ces expériences ayant été exé-

cutées en se servant de formes libres — *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* — la question se pose de savoir s'il en est de même quand les cellules sont logées dans la glaire, ainsi que protégées par des enveloppes de glaire résistantes. Cette glaire ne pourrait-elle jouer le rôle d'ultrafiltre, en ne laissant passer que les électrolytes et en fermant l'accès des cellules aux molécules plus grosses des substances organiques? L'hypothèse, difficile à démontrer, paraît probable. Elle expliquerait la pullulation exubérante de *formes glaireuses* et la rareté des *formes nues* dans la boue.

Mais, s'il s'agit d'adaptation, ne pourrait-on encore admettre que les formes libres du sol changent leur mode de végétation, sous l'influence des conditions d'un nouvel habitat? L'objection était à prévoir, mais elle ne tient pas debout devant le fait que toutes les espèces différentes, tant libres que zooglées, cultivées sur des plaques silico-gel, restent strictement fidèles à leurs caractéristiques et cela pendant des années. Les conditions étant pareilles, l'influence du facteur extérieur ne pourrait être invoquée dans ce cas. D'où il ressort que les caractères morphologiques décrits ne peuvent être attribués à des variations sous l'effet *immédiat* des facteurs extérieurs, mais qu'il s'agit là de races stables, dont les caractères adaptés à l'habitat se sont fixés au cours d'une longue suite de générations, leur assurant la prédominance au cours de la compétition pour la matière énergétique dans les milieux chargés de substances organiques.

Je suis très obligée à M. P. Jeantet pour les clichés artistiquement exécutés par lui. Je lui adresse mes meilleurs remerciements.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WARING. *Modern Methods of Sewage Disposal*, 1894.
- [2] SIR THOMAS WURDLE. *Sewage Treatment and Disposal*, 1893.
- [3] ADENEY. *R. Comm. Report*, **5**, 1905, App. I.
- [4] ADENEY et LETTS. *Ibid.*, 1905, App. IV.
- [5] EDWARD ARDERN et WILLIAM T. LOCKETT. *Journ. Soc. of Chem. Ind.*, **33**, 1914.
- [6] WILLIAM T. LOCKETT. *Journ. Soc. of Chem. Ind.*, **36**, 1917.

- [7] FOWLER. *Journ. Inst. of San. Eng.*, 1916.
- [8] FOWLER. *Surveyor*, March 1925.
- [9] BUSWELL (A. M.) et LONG (H. L.). *Microbiology and Theory of Activated Sludge. American Waterworks Association Journ. Baltimore*, **10**, 1923.
- [10] Mc GOWAN (G.). *The Nitrogen in Sewage. Inst. of San. Eng. Journ.*, Londres, **24**, 1920.
- [11] HAIGH JOHNSON (J. W.). *A Contribution to the Biology of Sewage Disposal. Journ. of Econom. Biol.*, **9**, 1914.
- [12] FOWLER (G. J.) et MUMFORD (E. M.). *Preliminary note on the Bacterial Classification in Sewage. Royal San. Inst. Journ.*, Londres, **34**, 1913.
- [13] ROBBINS, RUSSEL et BARTON (E.). *Bacteriological Study of Sewage Purification by Aeration. University of Illinois Bulletin, Water Survey Series*, n° 13, 1915.
- [14] DIENERT (F.). *La nature des boues activées. C. R. Ac. Sc.*, **165**, 1917, p. 1116-1117.
- [15] COURMONT (P.) et ROCHAIX (A.). *La flore bactérienne des eaux d'égout épurées par le procédé dit des « boues activées ». C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 75-76.
- [16] CAMBIER (R.). *Sur l'épuration des eaux d'égout par les boues activées. C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 681-684.
- [17] CAMBIER (R.). *Sur l'épuration des eaux d'égout par les boues activées. Ibid.*, **170**, 1920, p. 1417-1419.
- [18] CAMBIER (R.). *Sur l'épuration des eaux d'égout par les boues activées. Ibid.*, **171**, p. 57-60.
- [19] DIENERT (F.). *Sur la formation de la boue activée. C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 762-763.
- [20] DIENERT (F.) et GIRAULT, *Action des boues activées sur l'ammoniac de l'eau d'égout et de l'eau ordinaire. C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 899-901.
- [21] COURMONT (P.) et ROCHAIX (A.). *Action des microbes des eaux d'égout épurées par le procédé des « boues activées » sur les matières albuminoïdes, l'urée et les nitrates. C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 967-970.
- [22] DIENERT (F.), WANDENBULKE (F.) et M^{lle} LAUNEY (M.). *Sur l'action des boues activées. C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 1089-1092.
- [23] COURMONT (P.) et ROCHAIX (A.). *Action des microbes de la flore des eaux d'égout épurées par le procédé des « boues activées » sur les hydrates de carbone. C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 1134-1135.
- [24] COURMONT (P.), ROCHAIX (A.) et LAUPIN (F.). *Taux et rythme de la disparition de la matière organique au cours de l'épuration des eaux d'égout par le procédé des boues activées. C. R. Ac. Sc.*, **173**, 1920, p. 1190.
- [25] COURMONT (P.), ROCHAIX (A.) et LAUPIN (F.). *Sur le rythme de la disparition de l'ammoniaque au cours de l'épuration des eaux d'égout par le procédé des boues activées. C. R. Ac. Sc.*, **173**, 1920, p. 1498-1499.
- [26] CAVEL (L.). *Contribution à l'étude des boues activées. C. R. Ac. Sc.*, **179**, 1924, p. 1095-1098.

- [27] WINOGRADSKY (S.) et WINOGRADSKY (Hélène), Etudes sur la microbiologie du sol. VII. Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification. Ces *Annales*, **50**, 1933, p. 350-434.
- [28] WINOGRADSKY (H.), Sur la flore nitrificatrice des boues activées de Paris. *C. R. Ac. Sc.*, **200**, 1935, p. 1886-1888.
- [29] WINOGRADSKY (H.), On the Number and Variety of Nitrifying Organisms. *Transactions of the Third International Congress of Soil Science*, **4**, 1935.

EXPLICATION DES PLANCHES

Clichés de M. Jeantet, photomicrographe de l'Institut Pasteur.

Les clichés ont été pris :

8 à 270 \times ; 10 à 450 \times ; 12 à 1.400 \times , tout le reste à 1.850 \times .

A la reproduction, le grossissement a été réduit d'un cinquième environ.

PLANCHE II.

- 1, *Nitrosogloea schizobacteroides*. Colonie âgée formant pseudo-tissu.
- 2, *Nitrosogloea merismoides*. La structure en tétrades dans un plan, accolées l'une à l'autre est bien visible.
- 3, *Nitrosogloea schizobacteroides*. On voit les bâtonnets articulés dont la zoogléa est formée.
- 3a, *Nitrosogloea schizobacteroides*. Jeune zoogléa.
- 4, *Nitrosocystis souche B. A.* Colonies enkystées.
- 5, *Nitrosocystis souche B. A.* Jeunes colonies enveloppées de glaire molle.
- 6, *Nitrosogloea membranacea*. Lambeau de membrane.

PLANCHE III.

- 7, *Nitrosomonas souche B. A.* Grand groupe de cellules libres.
- 8, *Nitrocystis sarcinoides*. Colonie entière enlevée du gel, environ 200 \times .
- 9, *Nitrosomonas souche B. A.*
- 10, *Nitrocystis sarcinoides*. Fragment d'une colonie âgée. On distingue, à gauche, le double contour d'une capsule. Environ 350 \times .
- 11, *Nitrocystis sarcinoides*. Petit fragment d'une colonie légèrement disloquée. On distingue la structure en paquets sarcinoïdes.
- 12, *Nitrocystis micropunctata*. Colonie entière enlevée du gel. Environ 1.200 \times .
- 13, *Nitrocystis micropunctata*. Petit fragment d'une colonie disloquée.

L'ANATOXINE DYSENTÉRIQUE
ET LA
PRÉPARATION DES SÉRUMS ANTI-DYSENTÉRIQUES
DE HAUTE VALEUR ANTITOXIQUE

(DEUXIÈME COMMUNICATION)

par K. HALAPINE et L. BASILEVSKAIA.

(*Section d'épidémiologie de l'Institut de Médecine expérimentale de Leningrad. Directeur de la Section :*
Prof. P. ZDRODOVSKI.)

L'anatoxine dysentérique a été préparée pour la première fois par Dumas et Ramon, en 1925, en faisant agir sur la toxine 6 p. 1.000 de formol (à 40 p. 100). Après un séjour à l'étuve (37°) pendant trente jours, la préparation ne tuait plus le lapin à la dose de 10 cent. cubes, tandis que 1/25 à 1/40 de centimètre cube de toxine tuait l'animal en trois à cinq jours. Deux injections de 0 c. c. 5 et 1 cent. cube, à huit jours d'intervalle, immunisaient le lapin contre 6 à 8 doses mortelles de toxine. Les chevaux immunisés par des doses croissantes (de 10 à 500 cent. cubes) de cette anatoxine, donnaient un sérum qui neutralisait la toxine : 1/200 à 1/400 de centimètre cube de sérum neutralisait 6 doses mortelles.

Presque en même temps, E. Glotowa (Moscou) a obtenu une anatoxine en partant d'une toxine additionnée de 3 à 4 p. 1.000 de formol et ayant séjourné trois à quatre semaines à l'étuve à 37°. Cependant, Lesbre et Verdeau n'ont pas réussi à obtenir la désintoxication complète de leur toxine avec 3 p. 1.000 de formol à 40 p. 100 : leur préparation tuait la souris à la dose de 0 c. c. 5 en injection intrapéritonéale. L'addition de formol ou d'un alcali à cette anatoxine augmentait sa toxicité. 6 p. 1.000 de formol et le séjour à 40° pendant trente jours donnaient un produit plus stable, qui était bien

supporté par la souris à la dose de 0 c. c. 5 en injection intrapéritonéale, et par le lapin à la dose de 2 cent. cubes en injection intraveineuse.

En 1929, Patzevitch et Boudakoff ont immunisé des chevaux avec une anatoxine et ont obtenu de bons résultats. 10 cent. cubes de cette anatoxine ne tuaient plus le lapin. Enfin, en 1931, Isabolinsky et Karpatchevskaya ont obtenu une anatoxine en faisant agir sur la toxine 5 p. 4.000 de formol à la température de 48° pendant six jours. 5 cent. cubes de cette anatoxine en injection sous-cutanée et 2 c. c. 5 injectés dans la veine n'avaient aucun effet nocif. Les lapins immunisés avec cette anatoxine supportaient 5 à 6 doses mortelles de toxine. D'après ces auteurs, les propriétés antigènes de l'anatoxine sont en raison directe de la toxicité initiale du filtrat dysentérique : c'est ainsi qu'un lapin immunisé avec une anatoxine préparée en partant d'une toxine tuant l'animal en trois jours à la dose de 1/50 de centimètre cube. le préservait de 200 DLM.

Depuis 1933, nous nous servons régulièrement de l'anatoxine dysentérique dans l'immunisation des chevaux et c'est aussi à partir de ce moment que nous avons entrepris une étude détaillée de ce produit.

PRÉPARATION DE L'ANATOXINE DYSENTÉRIQUE ET DÉTERMINATION DE SON POUVOIR ANTIGÈNE.

La souche dont nous nous servons pour la préparation de la toxine dysentérique est la souche « Voile 30 », de l'Institut Pasteur. Le milieu de culture : macération de viande avec 1 p. 100 de peptone Chapoteaut ou bien le bouillon Martin, alcalinisé jusqu'à $\text{pH} = 8,4$ avec de la soude caustique. Le bouillon est réparti dans des bouteilles de 2 à 3 litres (600 à 900 cent. cubes de bouillon par bouteille). La stérilisation se fait par la méthode de chauffage discontinu. Avant l'ensemencement, on fait plusieurs (3 ou 4) passages de culture successifs sur le même milieu. Lors de l'ensemencement, les bouteilles sont portées à l'étuve à 37°. Dès le lendemain, une mince pellicule discontinue apparaît, qui s'épaissit les jours suivants et couvre la surface du bouillon, rappelant la pelli-

cule diphtérique. La culture est laissée quinze jours à l'étuve, puis on filtre sur papier préparé à la craie et, au besoin, à travers une bougie de Berkefeld (pour les besoins de titrage et de floculation). La toxine filtrée est répartie dans des ballons d'un litre, on y ajoute 5 p. 1.000 de formol (38 à 39 p. 100) et on laisse les ballons pendant deux mois à l'étuve à 39-40°.

La dose mortelle de toxine pour les souris variait de 1/50 à 1/400 de centimètre cube. 1 cent. cube d'une dilution à 1/400 de toxine tuait les lapins en vingt-quatre à quatre-vingt-seize heures. En même temps, toutes les toxines étaient titrées *in vitro* par la floculation. Après deux mois d'étuve, les lapins ne supportaient pas 10 cent. cubes d'une toxine formolée en injection intraveineuse et succombaient du deuxième au sixième jour ; les souris survivaient à l'injection intraveineuse de 0 c. c. 5 dans 50 p. 100 des cas. La mort, quand elle avait lieu, survenait le sixième ou le septième jour. Le titrage d'une pareille anatoxine dénotait un reste de toxicité égale, en général, à 10-20 doses mortelles.

La réaction de floculation montrait une baisse considérable du titre antigénique de l'anatoxine par rapport à la toxine de départ ; de plus, la floculation apparaissait avec un très grand retard ; le Kf était deux, trois et même quatre fois plus long. Les changements s'opéraient d'une façon inégale dans les 3 zones de floculation. La plus affectée est la deuxième zone ; le titre, calculé par la floculation initiale, y baisse de moitié ; la première zone, au contraire, ne subit presque pas d'altération ; tout au plus, la floculation apparaît-elle dans un tube voisin. Un séjour trop prolongé à l'étuve peut faire disparaître la deuxième zone.

Donc, comme les auteurs français, nous n'avons pas pu désintoxiquer complètement les anatoxines dysentériques et avons opéré non pas avec des anatoxines proprement dites, mais avec des produits de toxicité très affaiblie.

Dans le but de désintoxiquer la toxine nous avons essayé, d'une part, d'augmenter la dose de formol jusqu'à 6 p. 1.000, et, d'autre part, de prolonger le séjour à l'étuve jusqu'à trois mois. L'anatoxine ainsi obtenue était moins toxique qu'auparavant, mais elle n'était pas complètement inoffensive pour les

animaux d'expérience. Néanmoins, nous fûmes forcés d'abandonner cette méthode de préparation, les produits obtenus étant considérablement dénaturés, le phénomène de floculation apparaissait avec un grand retard et dénotait une diminution notable du pouvoir immunisant.

En étudiant systématiquement la dynamique de la formation de la toxine dans le milieu de culture, nous avons constaté que plus la culture est vieille, plus son filtrat devient stable par rapport à la température. Nous avons supposé que les filtrats formolés des cultures jeunes (quarante-huit heures) doivent perdre leur toxicité relativement vite. En effet, le filtrat formolé N° 24-2, contenant 100 DLM dans 1 cent. cube, ne contenait que 10 DLM après une quinzaine de séjour à l'étuve.

Cependant, les jeunes filtrats, tout en perdant vite leur toxicité, perdent également leurs propriétés floculantes, ce qui tient probablement à la plus grande labilité des jeunes filtrats en général.

IMMUNISATION DES CHEVAUX

A L'AIDE DE L'ANATOXINE DYSENTÉRIQUE.

Nous avons eu à notre disposition 50 chevaux, dont une partie a déjà subi une longue période d'immunisation (deux à cinq ans) avec d'autres antigènes. Vu la toxicité, quoique très atténuée, de notre anatoxine, il fallait procéder avec une grande prudence avec ces chevaux vieux et affaiblis. Après quelques tâtonnements, nous avons adopté un schéma d'immunisation qui nous a permis d'introduire de grandes quantités d'antigène à bref délai sans provoquer de réactions fortes. Ces schémas (voir tableau I) nous ont permis de terminer le premier cycle d'immunisation en un mois et demi à deux mois, les cycles suivants en deux à trois semaines. L'immunisation s'effectuait toujours sous le contrôle de la réaction de floculation. De règle, une saignée d'épreuve était faite le cinquième jour après l'avant-dernière ou la dernière injection d'antigène ; on procédait alors à la titration du sérum par la floculation et par la méthode internationale (souris).

TABLEAU I. — Schéma de l'immunisation avec l'anatoxine dysentérique.

JOURS d'injection	1 ^{er} CYCLE de l'immunisation Dose d'anatoxine en centimètres cubes	2 ^e CYCLE de l'immunisation Dose d'anatoxine en centimètres cubes	3 ^e CYCLE de l'immunisation Dose d'anatoxine en centimètres cubes	APRÈS L'ANNÉE d'exploitation Dose d'anatoxine en centimètres cubes
1	15	100	300	500
3	25	200	500	800
10	50	300	800	
15	75	400		
20	100	600		
25	200			
30	300			
35	400			
40	600			
<p>Le 5^e jour, saignée d'épreuve, saignée définitive du 7^e au 9^e jour. En cas de titre insuffisant, injection de 800 cent. cubes AT.</p> <p>Le 5^e jour, saignée d'épreuve, saignée définitive du 7^e au 9^e jour. En cas de titre insuffisant, injection de 800 cent. cubes AT.</p> <p>Le 5^e jour, saignée d'épreuve, saignée définitive du 7^e au 9^e jour. En cas de titre insuffisant, injection de 1.000 cent. cubes de la même anatoxine ou 800 cent. cubes d'une anatoxine plus active.</p> <p>Le 5^e jour, saignée d'épreuve, saignée définitive du 7^e au 9^e jour. En cas de titre insuffisant, injection de 1.000 cent. cubes AT.</p>				

La relation entre le titre déterminé par la floculation et celui évalué dans l'épreuve biologique (relation dénommée par nous « coefficient individuel »), nous servait dans la suite pour la détermination par la floculation du titre antitoxique des saignées consécutives (du même cheval).

Les chevaux étaient saignés, comme d'habitude, le septième jour après la dernière injection d'anatoxine. C'est, on le sait, le terme où la quantité d'anatoxine dans le sang atteint son maximum.

Le schéma d'hyperimmunisation n'est, bien entendu, que relatif, des changements pouvant y survenir suivant l'état du cheval ou la qualité de l'antigène. La saignée faite, un mois de repos était accordé à l'animal et l'immunisation n'était recommencée que quand le cheval était complètement rétabli.

L'attention que nous avons toujours portée à la santé de nos chevaux, nous a permis de les exploiter longtemps sans voir baisser considérablement les titres de nos sérums.

LA QUALITÉ DES ANTIGÈNES
ÉVALUÉE D'APRÈS LES RÉSULTATS DE L'IMMUNISATION.

En immunisant nos chevaux avec différentes anatoxines dysentériques, nous avons eu l'occasion d'observer des oscillations du titre au cours de l'immunisation d'un même cheval. Ces oscillations chez un animal dont la santé était tout à fait satisfaisante, excluait l'idée d'un facteur constitutionnel individuel; il fallait donc les mettre sur le compte de la qualité inégale des antigènes employés. Avant d'avoir étudié les toxines à l'aide de la réaction de floculation avec un sérum à « trois zones » et avant de nous être assurés du rôle prépondérant de la première zone, nous nous sommes basés, dans le choix de l'antigène, sur la toxicité du filtrat au départ et sur la floculation initiale avec un sérum à double zone. Nous avons considéré comme meilleures les anatoxines préparées en partant d'un filtrat très toxique ou qui floculait à haute dose. Cependant, il nous est arrivé de voir que fréquemment les filtrats peu toxiques ou à dose floculante moindre donnaient *in vivo* des résultats meilleurs.

Nous étions donc tout à fait désorientés au début dans le choix de l'antigène pour l'immunisation des chevaux et les sérums à haute valeur antitoxique étaient le fait du hasard.

La propriété que possède un sérum à triple floculation de différencier par sa première zone dans un filtrat dysentérique la fraction la plus active (propriété que ne possède pas un sérum à 2 zones), a ouvert une nouvelle voie dans l'évaluation de l'antigène dysentérique.

Les échantillons des toxines et anatoxines (que nous gardons toujours) qui avaient fourni des sérums à taux d'antitoxine élevé, ainsi que les produits nouvellement préparés, ont été floculés avec un sérum à trois zones, afin de rechercher la zone de floculation prépondérante (première zone), et de voir le rôle qu'elle joue dans la détermination du pouvoir immunisant de l'anatoxine.

Le tableau II montre la toxicité des filtrats pour les lapins et les souris, la toxicité restante de l'anatoxine, évaluée en DLM, la dose floculante de la première zone des sérums à double et à triple floculation, les résultats de l'immunisation.

TABLEAU II. — Valeur comparée des toxines et anatoxines dysentériques.

NUMÉRO des séries	TOXINES				ANATOXINES				RÉSULTATS de l'immunisation des chevaux
	Toxicité		Dose de sérum flocculant 1 cent. cube de toxine		Toxicité		Dose de sérum flocculant 1 cent. cube de toxine		
	Lapin injection intraveineuse de 0 c. c. 01	Souris DLM	Sérum à double flocculation (400 AE) 1 ^{re} zone	Sérum à triple flocculation (1.500 AE) 1 ^{re} zone	Lapin injection intraveineuse de 10 cent. cubes	Souris DLM	Sérum à double flocculation (400 AE) 1 ^{re} zone	Sérum à triple flocculation (1.500 AE) 1 ^{re} zone	
30	1, † le 5 ^e jour. 2, † le 5 ^e jour.	50	0,013	0,006	† le 5 ^e jour.	10		0,0047	Efficacité 85 p. 100.
25	1, † le 6 ^e jour. 2, † le 5 ^e jour.	150	0,02	0,0053	† le 2 ^e jour.	20	0,01	0,005	Efficacité 72 p. 100.
31	† le 2 ^e jour.	100	0,02	0,0047	† le 3 ^e jour.	20	0,007	0,00033	Efficacité 46 p. 100.
32	† le 2 ^e jour.	150	0,013	0,0027	† le 2 ^e jour.	20	0,007	0,0027	Efficacité 0
39	—	150	0,01	0,004	—	—	—	0,004	—
41	—	50	0,01	0,0053	—	—	—	—	Premiers sérums à haut titre.
45	—		0,04	0,013	—	—	—	—	Titre 400-500 U. A.

Les 50 chevaux ont été divisés en plusieurs groupes et immunisés à l'aide des anatoxines dont les propriétés sont énumérées dans le tableau II. Tous les chevaux ont reçu chacun trois injections de différentes anatoxines (300, 500, 800 cent. cubes à cinq et six jours d'intervalle). En cas de résultats peu satisfaisants, on injectait encore 800 cent. cubes d'une autre anatoxine.

TABLEAU III. — Pouvoir immunisant des différentes séries d'anatoxines dysentériques.

NOMS des chevaux	TITRE de l'immunisation précédente	TITRE] après l'expérience	RÉSULTAT de l'immunisation
AT série 25. — 11 chevaux.			
1. Négus	1.000	1.000	} Efficacité 72,7 p. 100, sans changement 27,3 p. 100.
2. Saïd	1.000	1.000	
3. Sakla	400	1.000	
4. Saïl	3.000	10.000	
5. Rojok	500	900	
6. Pâtre	300	400	
7. Ecrevisse	300	300	
8. Le Brave	500	1.000	
9. Coq	450	700	
10. Kassim	300	700	
11. Zakhar	700	1.500	
AT série 30. — 7 chevaux.			
1. Zakhar	1.500	2.000	} Efficacité 85,7 p. 100, sans changement 14,3 p. 100.
2. Kassim	600	1.500	
3. Le Brave	700	1.100	
4. Saïd	1.000	2.000	
5. Paille	1.000	1.500	
6. Paysan	300	800	
7. César	370	370	
AT série 31. — 6 chevaux.			
1. Abeille	600	300	} Efficacité 16,6 p. 100, sans changement 33,4 p. 100, baisse de 50 p. 100.
2. Le Grand	600	200	
3. Boulanger	500	600	
4. Myosotis	700	700	
5. Marron	1.000	1.000	
6. Le Brun	600	420	
AT série 32. — 6 chevaux.			
1. Saül	10.000	5.000	} Efficacité 0 p. 100, sans changement 16,4 p. 100, baisse de 83,6 p. 100.
2. Pâtre	600	400	
3. Salamandre	500	300	
4. Saturne	2.000	1.500	
5. César	580	370	
6. Négus	1.200	1.200	

Les résultats de l'immunisation avec différentes séries d'anatoxines sont représentés dans le tableau III.

L'étude de ce tableau montre que les sérums des chevaux immunisés avec l'anatoxine N° 30 ont présenté une augmentation de titre de 85,7 p. 100; avec l'anatoxine N° 25, de 72,7 p. 100 ; avec le N° 31, 16 p. 100 ; la série N° 32 semblait être tout à fait inefficace, le titre ayant baissé de 84 p. 100.

Revenons au tableau II et comparons les données de laboratoire avec celles de l'immunisation.

Commençons par la toxicité. Nous voyons qu'il n'y a pas de parallélisme entre la toxicité exprimée en DLM (souris) et l'effet de l'immunisation. Les anatoxines N° 11 et N° 30, préparées en partant des toxines faibles (50 DLM) ont donné des résultats meilleurs que les anatoxines N° 31 et N° 32 dont la toxicité initiale était égale à 150 DLM. Enfin, les filtrats à toxicité pareille (100 à 150 DLM) peuvent être d'excellents antigènes (N° 25) dans un cas et ne présenter dans un autre qu'un effet immunisant faible (AT, série N° 31) ou même nul (N° 32).

Il n'y a donc pas de relation directe entre la toxicité initiale et les propriétés immunisantes de l'anatoxine dysentérique, comme l'affirment Isabolinsky et d'autres.

Voyons maintenant quels sont les rapports entre les propriétés immunisantes de l'anatoxine et la dose de sérum à 2 zones flocculant 1 cent. cube de toxine.

En étudiant les données de la flocculation dans la première zone avec un sérum à double flocculation, nous voyons que les toxines et les anatoxines correspondantes peuvent donner à titre égal un effet immunisant différent. C'est ainsi que le résultat de l'immunisation avec les anatoxines N° 30 et N° 32 à titre égal (0 c. c. 013) s'est traduit pour la première par un accroissement d'antitoxine de 85,7 p. 100, et pour la deuxième par une baisse de 84 p. 100.

Donc, la dose flocculante initiale obtenue avec un sérum à double zone ne peut servir à déterminer le pouvoir antigène d'une anatoxine. On remarque d'une façon générale, qu'une tendance à la diminution de la dose flocculante signifie un accroissement du pouvoir immunisant (série AT, 11, 39, 30).

Voyons maintenant les résultats de l'évaluation du pouvoir

antigène à l'aide d'un sérum à triple floculation. Ici, les relations entre la dose floculante (première zone) et le pouvoir immunisant sont nettes. Plus la dose floculante des toxines et des anatoxines (N. S. 30, 25, 31, 32) est petite, moins les résultats de l'immunisation sont bons. C'est ainsi que nous avons eu pour les toxines et anatoxines citées plus haut, les doses floculantes que voici :

Série 30	0 c. c. 006 à 0 c. c. 005	de sérum.
Série 25	0 c. c. 0053 à 0 c. c. 0047	—
Série 31	0 c. c. 0047 à 0 c. c. 0033	—
Série 32	0 c. c. 0027 à 0 c. c. 0027	—

Nous avons montré plus haut les résultats de l'immunisation.

En nous basant sur ces faits, nous pourrions énoncer que la dose floculante initiale de la première zone (d'un sérum à trois zones de floculation) caractérise la valeur antigène d'une anatoxine, cette valeur augmentant en raison directe de la quantité de sérum déterminée par la floculation initiale. Cependant, les observations ultérieures n'ont pas confirmé ces prévisions : les antigènes à doses floculantes deux fois plus grandes (par exemple série 45, dose floculante 0 c. c. 013) que la dose optima, n'ont pas donné l'effet immunisant auquel nous nous sommes attendus, fournissant des sérums à 400 et 500 U. A. seulement. Cette circonstance nous conduit à établir des limites plus étroites pour les doses floculantes optima pouvant servir à évaluer le pouvoir immunisant d'une anatoxine. Avec notre sérum-étalon (série N° 114), dilué à $\frac{1}{5}$, ces doses oscillent entre 0 c. c. 09 et 0 c. c. 05. Les relations de proportionnalité que nous avons constatées entre la dose floculante et le pouvoir immunisant nous ont fait considérer notre sérum-étalon comme un réactif biologique très sensible qui différencie à dose définie la fraction la plus active de l'antigène. Les antigènes à dose floculante dépassant 0 c. c. 09 ou descendant au-dessous de 0 c. c. 05 sont qualifiés comme inférieurs et ne servent pas à l'immunisation.

De plus, la pratique nous a montré qu'à côté de la première zone de floculation (d'un sérum-étalon à trois zones) le titre de la deuxième zone joue également un rôle dans l'évaluation

du pouvoir antigène ; à titre égal, dans la première zone, l'antigène est d'autant meilleur que la dose floculante de la deuxième zone est plus petite. Probablement, dans ce cas, on peut supposer une atténuation de l'antagonisme entre les différents constituants de l'antigène si complexe, qu'est le filtrat dysentérique.

L'EFFICACITÉ DE L'IMMUNISATION PAR L'ANATOXINE DYSENTÉRIQUE.

Le tableau N° IV est l'illustration de l'efficacité de la méthode d'hyperimmunisation individuelle combinée à l'emploi des anatoxines à pouvoir antigène élevé. Cette méthode

TABLEAU IV. — Titre des sérums antidysentériques après hyperimmunisation avec l'anatoxine.

CYCLE d'immunisation	SURNOM DES CHEVAUX								
	Paille	Sakl	Saturne	Saül	Marron	Négus	Kassim	Le Brave	Komissar
I	400	300	400	1.000	1.400	600	800	250	1.500
II	500	400	400	3.000	700	1.200	1.600	600	800
III	1.000	1.000	450	10.000	1.700	1.200	1.100	600	1.000
IV	700	1.000	800	5.000	850	1.200	1.400	1.000	2.000
V	1.400	1.000	5.000	10.000	4.000	1.200	1.000	1.000	1.250
VI	700	1.000	1.000	10.000	3.000	1.200	2.000	800	1.000
VII	1.400	1.000	2.700	2.000	3.000	600	2.000	800	1.400
VIII	1.400	2.000	1.600	10.000	1.500	700	600	—	2.000
IX	—	4.000	2.000	3.300	1.500	600	500	—	2.600
X	—	4.500	1.200	4.000	2.000	300	500	—	1.300
XI	—	4.500	4.000	8.000	2.000	—	1.800	—	—
XII	—	5.000	3.000	—	2.000	—	1.100	—	—
XIII	—	3.000	3.000	—	—	—	—	—	—
XIV	—	3.000	3.000	—	—	—	—	—	—
XV	—	3.000	3.000	—	—	—	—	—	—
XVI	—	4.000	3.000	—	—	—	—	—	—
XVII	—	5.000	2.500	—	—	—	—	—	—

permet d'obtenir à bref délai des sérums à valeur antitoxique très grande titrant jusqu'à 10.000 U.A. avec le titre moyen de 1.500-2.000 U.A. La durée de l'exploitation d'un cheval peut monter de trois à quatre ans.

CONCLUSIONS.

1° L'addition du formol aux filtrats dysentériques, d'après la formule 5 p. 1.000 de formol (39 p. 100) $\times 40^\circ \times$ deux mois, ne donne pas de produits atoxiques — des anatoxines vraies; ces préparations gardent un reste de toxicité égal à environ 20 DLM pour 1 cent. cube.

2° L'addition des quantités plus grandes de formol, de même qu'un séjour prolongé à l'étuve, ne rendent pas non plus les filtrats complètement atoxiques.

3° L'étude comparative des anatoxines et des toxines dont elles sont dérivées, à l'aide de la réaction de floculation, permet de déceler différents degrés de dénaturation des fractions toxiques. En général, la floculation initiale de la deuxième zone retarde beaucoup; sa dose initiale peut diminuer de moitié; quant à celle de la première zone, au contraire, elle apparaît plus vite sans présenter de changement de titre, ou tout au plus constate-t-on une légère diminution.

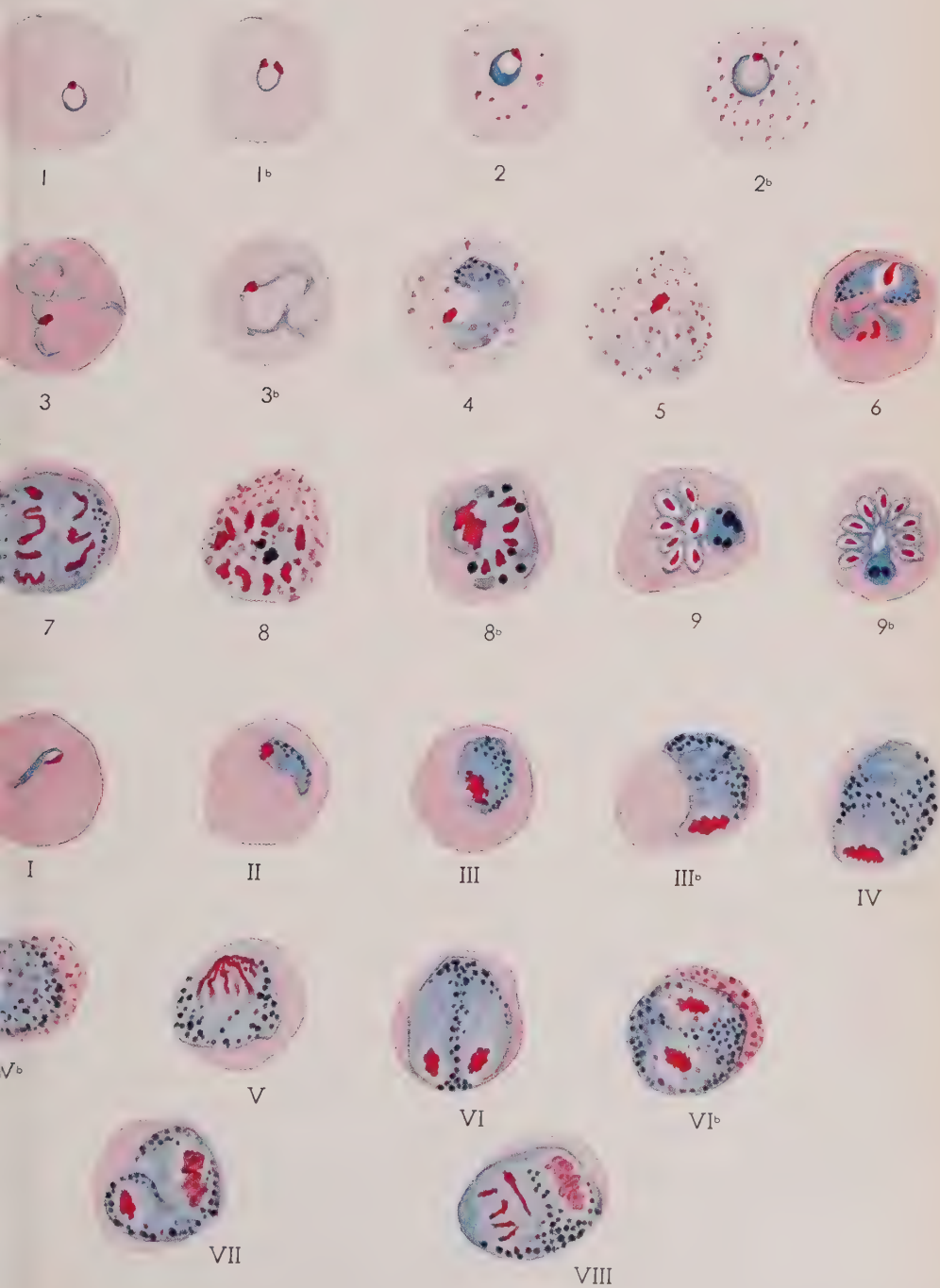
4° L'évaluation du pouvoir immunisant des anatoxines dysentériques (Shiga-Kruse) d'après la toxicité des filtrats, ou d'après la floculation initiale de la première zone des sérums à double floculation, n'a pas donné de preuves dans la pratique.

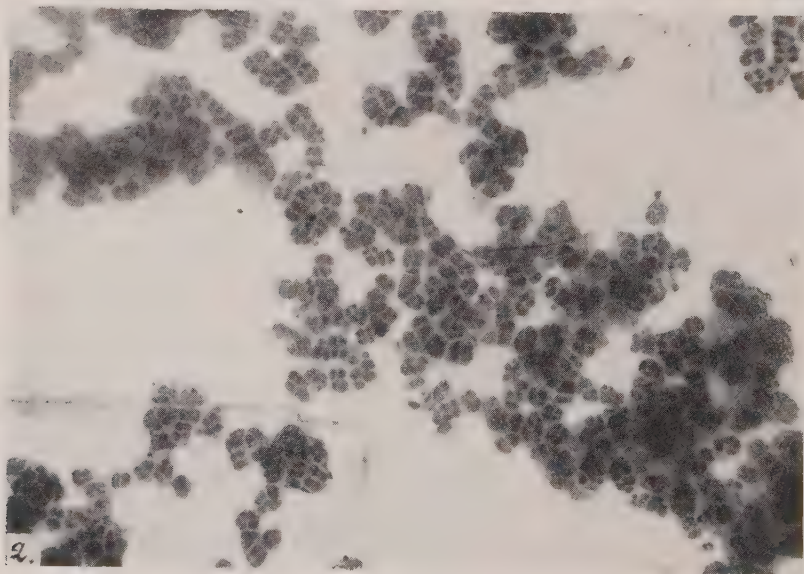
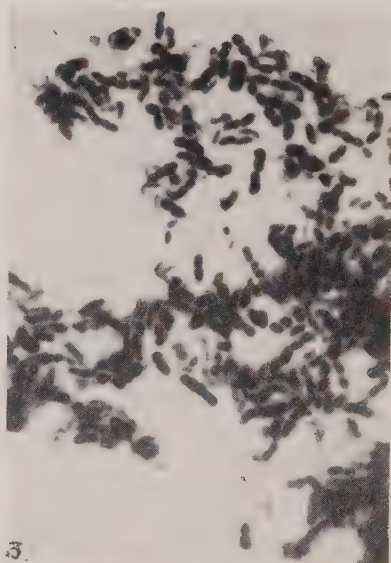
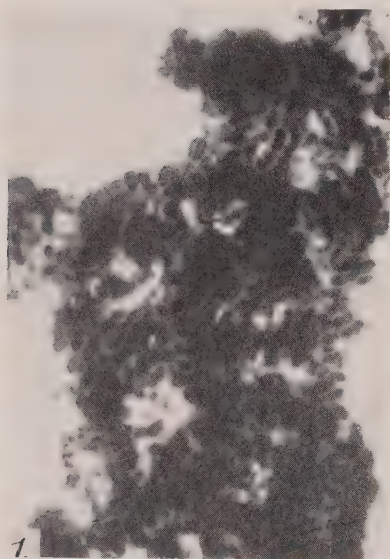
5° Le sérum à trois zones de floculation décèle, par la floculation initiale dans sa première zone, la fraction la plus active d'antigène, et permet d'évaluer son pouvoir immunisant intrinsèque, ce qui a été prouvé par l'immunisation en masse des chevaux.

6° Les antigènes les plus actifs au point de vue de leur pouvoir immunisant exigent, pour flocculer avec notre sérum-étalon dilué à $1/5$, des doses oscillant entre 0 c. c. 09 et 0 c. c. 05.

7° L'hyperimmunisation individuelle avec une anatoxine à pouvoir antigène suffisant, garantit la préparation des sérums antidysentériques de titre allant de 1.500 U.A. à 10.000 U.A. même, et permet l'exploitation prolongée des chevaux.

Le Gérant : H. MASSON.





3a

